

CHEMISCH-MOLEKULARBIOLOGISCHE STUDIEN ZUR
SUBSTRATSPEZIFITÄT VON KETOSYNTHASE-
DOMÄNEN IN *TRANS*-ÄT-POLYKETIDSYNTHASEN

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Christoph Kohlhaas

aus Daaden

Bonn (2013)

Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Gutachter:

1. Prof. Dr. Jörn Piel
2. Prof. Dr. Dirk Menche
3. Prof. Dr. Helmut Baltruschat
4. Prof. Dr. Gabriele M. König

Tag der Promotion: 13.12.2013

Erscheinungsjahr: 2014

Ich liebe es, wenn ein Plan funktioniert.

(John „Hannibal“ Smith)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Prof. Dr. Jörn Piel angefertigt.

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Jörn Piel bedanken, dass er mich in seinem Arbeitskreis aufgenommen und mir somit das Anfertigen dieser Arbeit erst ermöglicht hat. Für das anvertraute, interessante Thema danke ich ihm ebenso, wie für die stetige Diskussionsbereitschaft und die zahlreichen Anregungen, die entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke den Professoren der Prüfungskommission für die Übernahme der Gutachten dieser Arbeit. Für die finanzielle Unterstützung danke ich dem Graduiertenkolleg GRK 504.

Ich danke Petra Pöplau, Sarah Frank, Fritzi Schäfers, René Richarz, Max Crüsemann, Ursula Steffens, Frank Eggert, Eric Helferich, Dr. Tobias Gulder und Dr. Mike Freeman für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ich danke der Analytik-Abteilung für die Messung unzähliger NMR- und Masse- Proben. Weiterhin danke ich Andreas Schneider für das Aufreinigung der Substrate mittels HPLC.

Ich danke allen aktuellen und ehemaligen Kollegen des AK Piel für die nette Zusammenarbeit und das stets freundschaftliche Klima in der Arbeitsgruppe. Bedanken möchte ich mich auch bei unseren Nachbar-Arbeitskreisen (AK Gansäuer, AK Höger) für die Zurverfügungstellung von Geräten und Chemikalien. Besonders hervorheben möchte dabei das Gansäuer-Exillabor.

Besonders erwähnen und bedanken möchte ich mich auch bei den Kollegen in unserem Exillabor (Sarah Frank, Petra Pöplau, Stefan Künne, Frank Eggert und Pia Schmidt). Es war eine tolle Zeit und hat Spaß gemacht mit Euch zu arbeiten.

Ich danke Fritzi Schäfers, René Richarz, Max Crüsemann, Petra Pöplau, Sarah Frank, Frank Eggert, Annette Kampa, Stefan Künne, Brandon Morinaka und Mike Freeman für die vielen, stets netten Abende. Ihr habt es geschafft, dass sich ein Landei in Bonn wohlfühlt.

DANKSAGUNG

Ich danke Annette Kampa und Matthew Jenner für die produktive Zusammenarbeit beim Ketosynthesen-Projekt.

Vielen Dank an die unzähligen Praktikanten, die mal mehr, mal weniger zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank geht an Maria, die mir immer zur Seite steht. Danke dafür, dass du mich bremst, wenn ich übertreibe. Mich motivierst, wenn ich keine Lust habe. Mich aufbaust, wenn was nicht funktioniert hat. Mir zuhörst, wenn ich was erzählen möchte. Danke für die schöne Zeit.

Last but not least: Ich danke meiner Familie für die ganze Unterstützung, die ich immer bekommen habe. Ich danke meinen Eltern, dass sie immer für mich da sind. Diese Arbeit ist auch für euch.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|------|
| Inhaltsverzeichnis..... | I |
| Abbildungsverzeichnis..... | IV |
| Tabellenverzeichnis..... | XIV |
| Erläuterungen und Abkürzungen..... | XV |
| Zusammenfassung..... | XIX |
| Abstract..... | XXIV |
| 1 Einleitung..... | 1 |
| 1.1 Polyketidsynthesen und Polyketide..... | 2 |
| 1.1.1 Biosynthese von Polyketiden | 3 |
| 1.1.2 Klassifizierung von Polyketidsynthesen | 7 |
| 1.2 Nicht-ribosomale Peptidsynthesen..... | 13 |
| 1.2.1 Biosynthese von nicht-ribosomalen Peptiden..... | 14 |
| 1.2.2 Hormaomycin – Struktur, Eigenschaften und Biosynthese | 17 |
| 1.3 NRPS-PKS Hybride | 19 |
| 1.3.1 Bacillaen – Struktur, Eigenschaften und Biosynthese | 20 |
| 1.3.2 Psymberin – Struktur, Eigenschaften und Biosynthese | 22 |
| 1.4 <i>In-vivo</i> - und <i>In-vitro</i> -Techniken zur Analyse von Biosynthesewegen..... | 24 |
| 1.4.1 <i>In-vivo</i> -Techniken | 25 |
| 1.4.2 <i>In-vitro</i> -Techniken | 25 |
| 1.5 ARCUT-System..... | 26 |
| 1.5.1 Funktionsprinzip..... | 26 |
| 1.5.2 pcPNA-Stränge – Aufbau und Eigenschaften | 27 |
| 1.5.3 Ce(IV)/EDTA-Komplex..... | 30 |
| 2 Zielsetzung..... | 31 |
| 2.1 Untersuchung der Substratspezifität von KS-Domänen in <i>trans</i> -AT Polyketidsynthesen..... | 31 |
| 2.2 Synthese von Substraten zur Untersuchung der Pyranbiosynthese in der Misakinolid A-PKS | 36 |

| | | |
|-------|--|----|
| 2.3 | Synthese von <i>cis</i> -Propenylprolin zur Untersuchung der Hormaomycin-Biosynthese..... | 38 |
| 2.4 | Synthese von pcPNA-Strängen zur ARCUT-basierten DNA-Schnitt im Psymberin-Gencluster | 39 |
| 3 | Ergebnisse und Diskussion | 43 |
| 3.1 | Studien zur Substratspezifität in <i>trans</i> -AT Polyketid-synthasen | 43 |
| 3.1.1 | <i>In-vitro</i> -Methode und Proof-of-Principle | 43 |
| 3.1.2 | Analyse der Bacillaen KS 1 Substratspezifität | 47 |
| 3.1.3 | Analyse der Bacillaen KS 2 Substratspezifität für die γ,δ -Position | 54 |
| 3.1.4 | Synthese von Substraten für die Untersuchung der Bacillaen KS 4 Substratspezifität..... | 59 |
| 3.1.5 | Resümee und Folgerungen für die kombinatorische Biosynthese..... | 74 |
| 3.2 | Synthese von Substraten zur Untersuchung der Pyranbiosynthese in der Misakinolid A-PKS..... | 75 |
| 3.3 | Synthese von <i>cis</i> -(<i>Z</i>)-4-Propenylprolin zur Untersuchung der Hormaomycin-Biosynthese..... | 79 |
| 3.4 | Synthese von pcPNA-Oligomeren für die ARCUT-basierte Manipulation des Psymberinclusters | 81 |
| 3.4.1 | Synthese der nicht-kommerziell verfügbaren Monomeren | 82 |
| 3.4.2 | Untersuchung des Psymberin-Genclusters auf ARCUT geeignete Sequenzen | 84 |
| 3.4.3 | Synthese der pcPNA-Oligomere..... | 85 |
| 3.5 | Zusammenfassung und Ausblick..... | 87 |
| 4 | Experimenteller Teil..... | 93 |
| 4.1 | Material und Methoden..... | 93 |
| 4.1.1 | Chemikalien und Lösungsmittel | 93 |
| 4.1.2 | Kernresonanzspektroskopie | 93 |
| 4.1.3 | Massenspektrometrie | 93 |
| 4.1.4 | Infrarotspektroskopie | 94 |
| 4.1.5 | Dünnschichtchromatographie | 94 |
| 4.1.6 | Säulenchromatographie..... | 94 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 4.1.7 | High Performance Liquid Chromatography (HPLC) | 94 |
| 4.1.8 | HPLC-HRMS | 94 |
| 4.1.9 | Allgemeine Arbeitsmethoden | 95 |
| 4.2 | Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV) | 95 |
| 4.2.1 | AAV 1: Amidknüpfung mit EDC-HCl und HOBt als Kupplungsreagenzien | 95 |
| 4.2.2 | AAV 2: Basenkatalysierte Entschützung von Estern ¹⁰⁷ | 95 |
| 4.2.3 | AAV 3: Synthese der SNAC-Thioester mit EDC-HCl und HOBt als Kupplungsreagenzien | 96 |
| 4.2.4 | AAV 4: Synthese der SNAC-Thioester mit CDI als Kupplungsreagenz | 96 |
| 4.2.5 | AAV 5: Synthese <i>cis</i> -konfigurierten, α,β -ungesättigten Estern mittels Still-Gennari-Olefinierunggg | 96 |
| 4.2.6 | AAV 6: Palladium-katalysierte Entschützung von Benzylestern | 97 |
| 4.3 | Synthesevorschriften | 97 |
| 4.3.1 | Substrate für das Proof-of-Principle | 97 |
| 4.3.2 | Substrate zur Analyse der Bacillaen KS 1 Substratspezifität | 98 |
| 4.3.3 | Substrate zur Analyse der Bacillaen KS 2 Substratspezifität | 111 |
| 4.3.4 | Substrate zur Analyse der Bacillaen KS4 Substratspezifität | 119 |
| 4.3.5 | Substrate zur Analyse der Pyranbiosynthese der Misakinolid A PKS | 156 |
| 4.3.6 | Synthese von <i>cis</i> -(<i>Z</i>)-4-Propenylprolin Hydrochlorid (109) | 164 |
| 4.3.7 | Synthese der pcPNA-Oligomere für den Einsatz im ARCUT-System | 164 |
| 5 | Literaturverzeichnis | 170 |
| 6 | Anhang | 181 |
| 6.1 | NMR-Spektren | 181 |
| 6.2 | LC-HRMS-Daten | 275 |
| 7 | Publikationen | 277 |
| 8 | Selbstständigkeitserklärung | 279 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Prontosil (1), Penicillin G (2), Tetracyclin (3) und Vancomycin (4). | 1 |
| Abbildung 2: Klinisch relevante Polyketide Erythromycin (5), Epothilon (6) und Doxorubicin (7). | 2 |
| Abbildung 3: A) Mechanismus der Aktivierung des Acyl-Bausteins 8 zum Acyl-CoA Derivat 12; B) Verwendete Substrate 13, 14 der PKS und FAS; C) Weitere Bausteine 15-19, die in PKS verwendet werden. ¹⁴ | 3 |
| Abbildung 4: Aktivierung des <i>apo</i> -ACP zum <i>holo</i> -ACP mittels einer PPTase. | 4 |
| Abbildung 5: A) AT-katalysierte Beladung einer <i>holo</i> -ACP mit dem aktivierten Acyl-Baustein 8, B) Claisen-artige Kettenverlängerungsreaktion: Zuerst überträgt das ACP ₁ die Startereinheit (in den folgenden Verlängerungsschritten die wachsende Kette) auf die KS. Diese katalysiert die Kondensation zwischen dem beladenen Substrat und der Elongationseinheit 14 oder 18, gebunden an der ACP ₂ . ACP ₁ und ACP ₂ stellen zwei aufeinanderfolgende ACPs dar. | 5 |
| Abbildung 6: Reduktionskaskade in FAS und PKS durch die Enzyme KR, DH und ER. | 5 |
| Abbildung 7: Genereller Abspaltungsmechanismus einer TE: Nach der kovalenten Bindung des Substrats an die TE kann das Polyketid als offenkettige Säure (I) oder durch Makrozyklisierung (II) freigesetzt werden. ¹⁷ | 6 |
| Abbildung 8: Klassifizierung von PKS. | 7 |
| Abbildung 9: Iterative Typ I PKS der Lovastatin (20) -Biosynthese in <i>Aspergillus terreus</i> ; SAM= S-Adenosylmethionin; * = SAM-abhängige Methylierung ¹¹ | 8 |
| Abbildung 10: Biosynthese des Erythromycin A (5). ¹¹ | 9 |
| Abbildung 11: <i>Cis</i> -AT-PKS mit integrierter AT und <i>trans</i> -AT-PKS mit freistehender AT. | 9 |
| Abbildung 12: Polyketide von <i>trans</i> -AT-PKS: Bacillaen (22) und Pederin (23). | 10 |
| Abbildung 13: Postulierte Biosynthese des Misakinolid A (24). ³¹ | 11 |
| Abbildung 14: Biosynthese des Doxorubicins (25). ¹¹ | 12 |
| Abbildung 15: Beispiel einer Typ III PKS anhand der Biosynthese von Naringenin-chalcon (26). ¹¹ | 13 |
| Abbildung 16: NRPS-Peptide: Daptomycin (27), Bleomycin A ₂ (28), Cyclosporin A (29) | 14 |
| Abbildung 17: A-Domänen katalysierte Aktivierung des Peptidbausteins 30 mit ATP (9) zum AMP-Derivat 31. | 15 |
| Abbildung 18: A) Aktivierung der PCP durch Übertragung einer 4'-Phosphopantetheinylgruppe; B) A-Domänen katalysierte Übertragung des Bausteins 31 auf das <i>holo</i> -PCP; C) C-Domänen katalysierte Kondensation zwischen zwei Bausteinen, gebunden an aufeinanderfolgenden PCPs (PCP ₁ und PCP ₂). | 16 |
| Abbildung 19: Hormaomycin (32). | 17 |
| Abbildung 20: Vorläufer-dirigierte Biosynthese: Austausch des natürlichen Fragments 33 gegen die Substrate 34-36, sowie des Fragments 37 gegen die Substrate 38-41. | 18 |
| Abbildung 21: A) <i>Hrm</i> -Gencluster (<i>HrmA-W</i>); die Farben kennzeichnen die putativen Aufgaben des ORF: Schwarz= Regulator- und Transportgene; Rot= putative Chcpa-Biosynthese, Grün= putative (4-Pe)Pro-Biosynthese, Weiß= Hormaomycin-Biosynthese, Blau= putative (3-Ncp)Ala- | |

| | |
|--|----|
| Biosynthese. B) putative Biosynthese des Hormaomycins (32); Kreise ohne Beschriftung repräsentieren PCP. | 19 |
| Abbildung 22: Metabolite von NRPS/PKS-Hybriden: Bleomycin (42) und FK 506 (43). | 20 |
| Abbildung 23: Biosynthese von Dehydrobacillaen (44) und Bacillaen (22); kleine Kreise ohne Beschriftung repräsentieren ACP (grün, rot, blau) bzw. PCP (orange); AL: Acyl-[ACP]-Ligase. | 21 |
| Abbildung 24: Mechanismus der β -Verzweigung in der Bacillaen-Biosynthese. | 22 |
| Abbildung 25: Biosynthetisches Endprodukt der Bacillaen-NRPS/PKS: Bacillaen B (46). | 22 |
| Abbildung 26: Postulierter Biosyntheseweg des Psymberins (47); kleine Kreise ohne Beschriftung repräsentieren ACP (grün, rot, blau) bzw. PCP (orange). | 24 |
| Abbildung 27: SNAC-Thioester 48 und CoA (11). | 25 |
| Abbildung 28: Adenin (49), Cytosin (50), Guanin (51) und Thymin (52). | 26 |
| Abbildung 29: Schematische Darstellung der Funktionsweise von ARCUT: A) Invasion doppelsträngiger DNA durch die pcPNA unter Ausbildung eines Doppel-Duplex-Komplexes, B) Angriff der Ce(IV)/EDTA-Spezies auf die einzelsträngige DNA und anschließende DNA-Spaltung. | 27 |
| Abbildung 30: Vergleich des Aufbaus von natürlicher DNA (links) mit dem Aufbau von pcPNA (rechts); rot: N-(2-Aminoethyl)glycin-Einheit, blau: Methylen carbonyl-Linker. | 27 |
| Abbildung 31: 2,6-Diaminopurin (53), 2-Thiouracil (54). | 28 |
| Abbildung 32: A) Watson-Crick Basenpaare: A-T (links) und G-C (rechts); B) Basenpaare D-T (links), A-U _S (mitte) und D-U _S (rechts). | 29 |
| Abbildung 33: (L)-Lysin (55) und (L)-Phosphoserin (56). | 29 |
| Abbildung 34: Mechanismus der säurekatalysierten <i>in situ</i> Derivatisierung des pcPNA-Oligomers beim Ablösen vom Trägerharz. | 30 |
| Abbildung 35: A) Ausschnitt aus der Bacillaen-Biosynthese, B) Ausschnitt aus der Psymberin-Biosynthese; nummeriert sind die KS-Domänen, deren Substratspezifität getestet werden sollte. | 32 |
| Abbildung 36: A) Substrate 57a und 57b, die im Rahmen dieser Promotion für die Untersuchung der Substratspezifität synthetisiert werden sollten; B) Substrate 58-63 die im Rahmen einer anderen Promotion synthetisiert wurden. | 32 |
| Abbildung 37: Substrate 64a-c und 65-71 für die Untersuchung Substratspezifität der KS 1. | 33 |
| Abbildung 38: Substrate 72-75 für die Untersuchung der Substratspezifität der KS 2. | 34 |
| Abbildung 39: Volllängensubstrate 76-79 für die Untersuchung der KS 4 der Bacillaen-Biosynthese. | 34 |
| Abbildung 40: Retrosynthese des SNAC-Thioesters 76. | 35 |
| Abbildung 41: Retrosynthese des Thioesters 79. | 36 |
| Abbildung 42: Ausschnitt aus der Misakinolid A Biosynthese. | 36 |
| Abbildung 43: Substrate 90 und 91 für die Präferenzanalyse der Misakinolid KS 16. | 37 |
| Abbildung 44: Retrosynthese des Pyransubstrats 90. | 38 |
| Abbildung 45: Retrosynthese des Substrats 91. | 38 |
| Abbildung 46: Retrosynthese des Prolinderivats 109. | 39 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 47: Kommerziell erhältliche Monomere 110-113 für die pcPNA-Oligomer-Synthese. | 41 |
| Abbildung 48: Retrosynthese des D _M 115b . | 41 |
| Abbildung 49: Retrosynthese des U _{S,M} 118b . | 42 |
| Abbildung 50: <i>In-vitro</i> -Methode zur Analyse der KS-Substratspezifität. | 44 |
| Abbildung 51: Synthese der β -Hydroxysubstrate 57a, b ; DCC: <i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid, 4-DMAP: 4-(Dimethylamino)pyridin, r.t.: Raumtemperatur, ü/N: über Nacht. | 44 |
| Abbildung 52: Zeitlich aufgelöste Massenänderung der exprimierten KS 5 der Bacillaen-PKS während der Inkubation mit Substrat 60 . | 45 |
| Abbildung 53: Zeitaufgelöste Acylierung mit den Substraten 57a, 57b, 58-63 ; A) Psymberin KS 1, B) Psymberin KS 2, C) Psymberin KS 3, D) Bacillaen KS 5. | 45 |
| Abbildung 54: Ausschnitt aus der Bacillaen-PKS. KS 1 prozessiert das Intermediat eines NRPS-Moduls (orange), das Glycin (rot) inkorporiert. | 48 |
| Abbildung 55: Synthese der SNAC-Substrate 64a-c ; TsO: Tosylat, EDC-HCl: 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid, HOBt: 1-Hydroxybenzotriazol, NMM: <i>N</i> -Methylmorpholin, THF: Tetrahydrofuran, MeOH: Methanol, CDI: Carbonyldiimidazol. | 48 |
| Abbildung 56: Synthese des Thioesters 65 ; Et ₃ N: Triethylamin, Boc ₂ O: Di- <i>tert</i> -Butyldicarbonat. | 49 |
| Abbildung 57: Synthese des SNAC-Thioesters 69 ; AcCl: Acetylchlorid, DIEA: Diisopropylethylamin. | 50 |
| Abbildung 58: Synthese der Thioester 66-68, 70, 71 ausgehend von den Säuren 130a-e mittels etablierten Methoden der Peptidsynthese (A oder B). | 50 |
| Abbildung 59: Zeitaufgelöste Acylierung der Bacillaen KS1 mit den Substraten 64a-c, 65-68 , sowie der Inkubation der N206A-Mutante mit dem SNAC-Thioester 64a (gestrichelte Linie, 64a _{Mut.}). | 51 |
| Abbildung 60: Ausschnitt aus Bacillaen-PKS, KS 2 prozessiert ein in α,β -Position vollständig reduziertes Substrat, Rot: γ,δ -Position. | 54 |
| Abbildung 61: Synthese des SNAC-Thioesters 72 . | 55 |
| Abbildung 62: Synthese des Thioesters 73 . | 55 |
| Abbildung 63: Mechanismus der Johnson-Orthoester-Umlagerung zur Synthese des Esters 135a . | 56 |
| Abbildung 64: Synthese des δ -Methoxythioesters 74 ; PDC: Pyridiniumdichromat. | 56 |
| Abbildung 65: Synthese des β -Methoxysubstrats 75 ; <i>n</i> -BuLi: <i>n</i> -Butyllithium, DMSO: Dimethylsulfoxid. | 57 |
| Abbildung 66: Zeitaufgelöste Acylierung der Bacillaen KS 2 mit den Substraten 59, 62, 67, 68, 73-75 . | 58 |
| Abbildung 67: Keto-Enol-Tautomerie des β -Ketothioesters 62 . | 59 |
| Abbildung 68: Ausschnitt aus der Bacillaen-PKS: KS 4 prozessiert ein <i>cis</i> -konfiguriertes α,β -ungesättigtes Substrat; Rot: Bereich der auf Substratspezifität untersucht werden sollte. | 60 |
| Abbildung 69: Synthese des SNAC-Thioesters 76 ; TBS-Cl: <i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid, MS 4 Å: Molekular-sieb 4 Å, KHMDS: Kaliumhexamethyldisilazan. | 61 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 70: Still-Gennari-Olefinierung: A) <i>In situ</i> Erzeugung des Phosphonatcarbanions 151 unter stark dissoziativen Bedingungen; B) Geschwindigkeitsbestimmender Schritt: Nukleophiler Angriff des Carbanions 151 am Aldehyd 152 unter der Ausbildung der Diastereomeren 153a,b ; C) Ausbildung des Oxaphosphetan 154 und Eliminierung zum (<i>Z</i>)-konfigurierten Alken 155 | 62 |
| Abbildung 71: Synthese des SNAC-Thioesters 77 ; Et ₃ N: Triethylamin..... | 63 |
| Abbildung 72: Mechanismus der Wittig-Reaktion: Eine [2+2]-Cycloaddition führt zu den Diastereomeren 158a, b , die dann zu den jeweiligen Olefinen 159a oder 159b eliminieren. | 63 |
| Abbildung 73: Synthese der Konfigurationsisomere 163a, b | 64 |
| Abbildung 74: A) Intramolekulare Zyklisierung des Aldehyds 165 zum Halbaminal 166 mit den ungefähren Verschiebungen der relevanten C-Atome im ¹³ C-NMR, B) Ausschnitt aus dem ¹³ C-NMR-Spektrum des Aldehyds 83 | 65 |
| Abbildung 75: Synthese des γ -Methyl-substituierten SNAC-Thioesters 78 ; TBAF: Tetrabutylammoniumfluorid, PyBop: Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat. | 66 |
| Abbildung 76: Dimerisierung des Amins 167b durch eine 1,4-Addition zum Substrat 169 | 66 |
| Abbildung 77: Versuch der Synthese des Alkins 170b mittels Grignard-Addition an <i>N</i> -Boc-2-aminoacetaldehyd (85); Et ₂ O: Diethylether. | 67 |
| Abbildung 78: Reaktionsprodukte des Grignards 171a mit Elektrophilen (E ⁺). | 68 |
| Abbildung 79: Versuch der Synthese des Alkins 177 über einen nukleophilen Angriff am Epoxid 175 ; <i>m</i> -CPBA: <i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure (engl. <i>meta</i> -Chlorperbenzoic acid), Me ₂ AlCl: Dimethylaluminiumchlorid..... | 69 |
| Abbildung 80: Synthese des Alkohols 179a ausgehend von 4-Amino-3-hydroxybuttersäure (178a). | 70 |
| Abbildung 81: Versuch der selektiven Aminoentschützung von Substrat 179b | 71 |
| Abbildung 82: Synthese des Alkohols 180b ; TBDPS-Cl: <i>tert</i> -Butyldiphenylsilylchlorid..... | 71 |
| Abbildung 83: Versuch der Synthese des Alkohols 179h | 72 |
| Abbildung 84: Synthese des SNAC-Thioesters 79 ; MeOTf: Methyltrifluormethan-sulfonat. | 73 |
| Abbildung 85: Regel für die kombinatorische Biosynthese von <i>trans</i> -AT-PKS-Systemen: Hypothetischer Modulaustausch (Blau gegen Rot) A) Der Austausch eines Moduls führt vermutlich zu keinem künstlichen Polyketid, da die nachfolgende KS aufgrund ihrer Substratspezifität das neue Intermediat nicht weiter prozessiert, B) Der Austausch von Domänen mit zugehöriger KS-Domäne aus dem folgenden Modul führt wahrscheinlich zu nicht-natürlichen Polyketiden. | 75 |
| Abbildung 86: Synthese des Pyransubstrats 90 ; PCC: Pyridiniumchlorochromat, NaOAc: Natriumacetat, TMS-Cl: Trimethylsilylchlorid, Ts-Cl: <i>para</i> -Toluolsulfonsäurechlorid. | 77 |
| Abbildung 87: Versuch der Synthese des Thioesters 91 über eine späte Hydrierung des Alkins 102b | 78 |
| Abbildung 88: Synthese des offenkettigen Substrats 91 mittels früher Hydrierung des Alkins 100 | 79 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 89: Synthese von <i>cis</i> -(<i>Z</i>)-4-Propenylprolin Hydrochlorid (109); Bu ₄ N ⁺ Br ⁻ : tetra- <i>n</i> -Butylammonium-bromid, MsCl: Methylsulfonylchlorid; Bu ₄ N ⁺ CN ⁻ : tetra- <i>n</i> -Butylammoniumcyanid, ACN: Acetonitril, Ph ₃ PEt ⁺ Br ⁻ : Ethyltriphenylphosphoniumbromid, <i>t</i> -BuOK: Kalium- <i>tert</i> -butanolat. | 80 |
| Abbildung 90: Synthese des Peptidrückgrats 189 . | 82 |
| Abbildung 91: Synthese des Rapoport-Reagenz (193). | 83 |
| Abbildung 92: Synthese des Diaminopurin-Monomers 115b ; Cbz: Benzyloxycarbonyl, DhbtOH: 3,4-Dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazin. | 83 |
| Abbildung 93: Synthese von Thiouracil-Monomers 118b ; PMB-Cl: <i>para</i> -Methoxybenzoylchlorid, NaOEt: Natriumethanolat, HBTU: 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat. | 84 |
| Abbildung 94: Ausschnitt der <i>psyD</i> -Gensequenz; rot umrandet: Sequenzen, an denen die pcPNA-Oligomere 193 und 194 binden sollen. | 85 |
| Abbildung 95: Struktur des synthetisierten pcPNA ₁ -Oligomers 193 . | 85 |
| Abbildung 96: Struktur des synthetisierten pcPNA ₂ -Oligomers 194 . | 86 |
| Abbildung 97: Kettenverlängerungsreaktion: A) säurekatalysierte Entschützung des <i>N</i> -Terminus, B) HBTU- initiierte Verlängerung um einen Monomerbaustein, C) Blockierung freier Aminogruppen mit Rapoport-Reagenz (192); DECA: <i>N,N</i> -Diethylcyclohexylamin. | 87 |
| Abbildung 98: Sequenz der synthetisierten pcPNA-Stränge 193 , 194 . | 166 |
| Abbildung 99: ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Benzylesters 123a . | 181 |
| Abbildung 100: ¹³ C-NMR-Spektrum (100 MHz) des Benzylesters 123a . | 182 |
| Abbildung 101: ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Benzylesters 123b . | 182 |
| Abbildung 102: ¹³ C-NMR-Spektrum (100 MHz) des Benzylesters 123b . | 183 |
| Abbildung 103: ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Benzylesters 123c . | 183 |
| Abbildung 104: ¹³ C-NMR-Spektrum (100 MHz) des Benzylesters 123c . | 184 |
| Abbildung 105: ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure 124a . | 184 |
| Abbildung 106: ¹³ C-NMR-Spektrum (75 MHz) der Säure 124a . | 185 |
| Abbildung 107: ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure 124b . | 185 |
| Abbildung 108: ¹³ C-NMR-Spektrum (75 MHz) der Säure 124b . | 186 |
| Abbildung 109: ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure 124c . | 186 |
| Abbildung 110: ¹³ C-NMR-Spektrum (100 MHz) der Säure 124c . | 187 |
| Abbildung 111: ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 64a . | 187 |
| Abbildung 112: ¹³ C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 64a . | 188 |
| Abbildung 113: ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 64b . | 188 |
| Abbildung 114: ¹³ C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 64b . | 189 |
| Abbildung 115: ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 64c . | 189 |
| Abbildung 116: ¹³ C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 64c . | 190 |
| Abbildung 117: ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Benzylesters 128a . | 190 |
| Abbildung 118: ¹³ C-NMR-Spektrum (100 MHz) des Benzylesters 128a . | 191 |
| Abbildung 119: DEPT-135-Spektrum (100 MHz) des Benzylesters 128a . | 191 |
| Abbildung 120: ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Benzylesters 128b . | 192 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 121: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz) des Benzylesters 128b | 192 |
| Abbildung 122: DEPT-135-Spektrum (100 MHz) des Benzylesters 128b | 193 |
| Abbildung 123: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure 129 | 193 |
| Abbildung 124: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz) der Säure 129 | 194 |
| Abbildung 125: DEPT-135-Spektrum (100 MHz) der Säure 129 | 194 |
| Abbildung 126: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 69 | 195 |
| Abbildung 127: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 69 | 195 |
| Abbildung 128: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 69 | 196 |
| Abbildung 129: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Glycinderivats 126 | 196 |
| Abbildung 130: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Glycinderivats 126 | 197 |
| Abbildung 131: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Glycinderivats 126 | 197 |
| Abbildung 132: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Glycinthioesters 65 | 198 |
| Abbildung 133: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz) des Glycinthioesters 65 | 198 |
| Abbildung 134: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 66 | 199 |
| Abbildung 135: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 66 | 199 |
| Abbildung 136: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 67 | 200 |
| Abbildung 137: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 67 | 200 |
| Abbildung 138: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 67 | 201 |
| Abbildung 139: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 68 | 201 |
| Abbildung 140: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 68 | 202 |
| Abbildung 141: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 68 | 202 |
| Abbildung 142: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Ethylesters 132a | 203 |
| Abbildung 143: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Ethylesters 132a | 203 |
| Abbildung 144: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Ethylesters 132a | 204 |
| Abbildung 145: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure 132b | 204 |
| Abbildung 146: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) der Säure 132b | 205 |
| Abbildung 147: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) der Säure 132b | 205 |
| Abbildung 148: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 72 | 206 |
| Abbildung 149: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 72 | 206 |
| Abbildung 150: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 73 | 207 |
| Abbildung 151: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 73 | 207 |
| Abbildung 152: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Ethylesters 144 | 208 |
| Abbildung 153: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Ethylesters 144 | 208 |
| Abbildung 154: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Ethylesters 145a | 209 |
| Abbildung 155: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Ethylesters 145a | 209 |
| Abbildung 156: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure 145b | 210 |
| Abbildung 157: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) der Säure 145b | 210 |
| Abbildung 158: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 74 | 211 |
| Abbildung 159: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 74 | 211 |
| Abbildung 160: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 75 | 212 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 161: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 75 . | 212 |
| Abbildung 162: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Amids 82a . | 213 |
| Abbildung 163: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Amids 82a . | 213 |
| Abbildung 164: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Alkohols 82b . | 214 |
| Abbildung 165: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Alkohols 82b . | 214 |
| Abbildung 166: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Ethylesters 84a . | 215 |
| Abbildung 167: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz) des Ethylesters 84a . | 215 |
| Abbildung 168: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure 84b . | 216 |
| Abbildung 169: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) der Säure 84b . | 216 |
| Abbildung 170: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 76 . | 217 |
| Abbildung 171: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 76 . | 217 |
| Abbildung 172: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Esters 156a . | 218 |
| Abbildung 173: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz) des Esters 156a . | 218 |
| Abbildung 174: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure 156b . | 219 |
| Abbildung 175: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) der Säure 156b . | 219 |
| Abbildung 176: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 77 . | 220 |
| Abbildung 177: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 77 . | 220 |
| Abbildung 178: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Butanols 160c . | 221 |
| Abbildung 179: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Butanols 160c . | 221 |
| Abbildung 180: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Butanols 160d . | 222 |
| Abbildung 181: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Butanols 160d . | 222 |
| Abbildung 182: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Butanols 160d . | 223 |
| Abbildung 183: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Aldehyds 166 . | 223 |
| Abbildung 184: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Aldehyds 166 . | 224 |
| Abbildung 185: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Aldehyds 166 . | 224 |
| Abbildung 186: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Methylesters 167a . | 225 |
| Abbildung 187: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Methylesters 167a . | 225 |
| Abbildung 188: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Methylesters 167a . | 226 |
| Abbildung 189: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Hydrochlorids 167b . | 226 |
| Abbildung 190: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Hydrochlorids 167b . | 227 |
| Abbildung 191: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Hydrochlorids 167b . | 227 |
| Abbildung 192: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Amids 168a . | 228 |
| Abbildung 193: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Amids 168a . | 228 |
| Abbildung 194: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Amids 168a . | 229 |
| Abbildung 195: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure 168b . | 229 |
| Abbildung 196: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) der Säure 168b . | 230 |
| Abbildung 197: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) der Säure 168b . | 230 |
| Abbildung 198: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 78 . | 231 |
| Abbildung 199: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 78 . | 231 |
| Abbildung 200: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 78 . | 232 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 201: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure 178e | 232 |
| Abbildung 202: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) der Säure 178e | 233 |
| Abbildung 203: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Alkohols 179a | 233 |
| Abbildung 204: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Alkohols 179a | 234 |
| Abbildung 205: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Benzylethers 179b | 234 |
| Abbildung 206: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Benzylethers 179b | 235 |
| Abbildung 207: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Benzylethers 179i | 235 |
| Abbildung 208: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Benzylethers 179i | 236 |
| Abbildung 209: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Benzylethers 179i | 236 |
| Abbildung 210: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Alkohols 179j | 237 |
| Abbildung 211: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Alkohols 179j | 237 |
| Abbildung 212: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Alkohols 179j | 238 |
| Abbildung 213: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Aldehyds 181 | 238 |
| Abbildung 214: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Aldehyds 181 | 239 |
| Abbildung 215: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Aldehyds 181 | 239 |
| Abbildung 216: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Methylesters 182a | 240 |
| Abbildung 217: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Methylesters 182a | 240 |
| Abbildung 218: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Methylesters 182a | 241 |
| Abbildung 219: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Alkohols 182b | 241 |
| Abbildung 220: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Alkohols 182b | 242 |
| Abbildung 221: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Alkohols 182b | 242 |
| Abbildung 222: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Methylethers 182c | 243 |
| Abbildung 223: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Methylethers 182c | 243 |
| Abbildung 224: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Methylethers 182c | 244 |
| Abbildung 225: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Hydrochlorids 182d | 244 |
| Abbildung 226: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Hydrochlorids 182d | 245 |
| Abbildung 227: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Hydrochlorids 182d | 245 |
| Abbildung 228: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Amids 183a | 246 |
| Abbildung 229: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Amids 183a | 246 |
| Abbildung 230: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Amids 183a | 247 |
| Abbildung 231: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure 183b | 247 |
| Abbildung 232: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) der Säure 183b | 248 |
| Abbildung 233: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) der Säure 183b | 248 |
| Abbildung 234: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 79 | 249 |
| Abbildung 235: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 79 | 249 |
| Abbildung 236: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 79 | 250 |
| Abbildung 237: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Amins 160b | 250 |
| Abbildung 238: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Amins 160b | 251 |
| Abbildung 239: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Amids 161a | 251 |
| Abbildung 240: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Amids 161a | 252 |

| | | |
|----------------|---|-----|
| Abbildung 241: | ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Alkohols 161b | 252 |
| Abbildung 242: | ¹³ C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Alkohols 161b | 253 |
| Abbildung 243: | ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) des <i>cis</i> -Ethylesters 163a | 253 |
| Abbildung 244: | ¹³ C-NMR-Spektrum (75 MHz) des <i>cis</i> -Ethylesters 163a | 254 |
| Abbildung 245: | ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) des <i>trans</i> -Ethylesters 163b | 254 |
| Abbildung 246: | ¹³ C-NMR-Spektrum (75 MHz) des <i>trans</i> -Ethylesters 163b | 255 |
| Abbildung 247: | ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Alkohols 179d | 255 |
| Abbildung 248: | ¹³ C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Alkohols 179d | 256 |
| Abbildung 249: | DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Alkohols 179d | 256 |
| Abbildung 250: | ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Benzylethers 179e | 257 |
| Abbildung 251: | ¹³ C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Benzylethers 179e | 257 |
| Abbildung 252: | DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Benzylethers 179e | 258 |
| Abbildung 253: | ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Amins 179f | 258 |
| Abbildung 254: | ¹³ C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Amins 179f | 259 |
| Abbildung 255: | DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Amins 179f | 259 |
| Abbildung 256: | ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Amids 180a | 260 |
| Abbildung 257: | ¹³ C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Amids 180a | 260 |
| Abbildung 258: | ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Amids 180b | 261 |
| Abbildung 259: | ¹³ C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Amids 180b | 261 |
| Abbildung 260: | DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Amids 180b | 262 |
| Abbildung 261: | ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Alkins 87b | 262 |
| Abbildung 262: | ¹³ C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Alkins 87b | 263 |
| Abbildung 263: | ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Alkinesters 170a | 263 |
| Abbildung 264: | ¹³ C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Alkinesters 170a | 264 |
| Abbildung 265: | ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Alkins 177 | 264 |
| Abbildung 266: | ¹³ C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Alkins 177 | 265 |
| Abbildung 267: | ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure 98 | 265 |
| Abbildung 268: | ¹³ C-NMR-Spektrum (75 MHz) der Säure 98 | 266 |
| Abbildung 269: | ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 90 | 266 |
| Abbildung 270: | ¹³ C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 90 | 267 |
| Abbildung 271: | ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Methylesters 185a | 267 |
| Abbildung 272: | ¹³ C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Methylesters 185a | 268 |
| Abbildung 273: | ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure 185b | 268 |
| Abbildung 274: | ¹³ C-NMR-Spektrum (75 MHz) der Säure 185b | 269 |
| Abbildung 275: | ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 186 | 269 |
| Abbildung 276: | ¹³ C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 186 | 270 |
| Abbildung 277: | ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 91 | 270 |
| Abbildung 278: | ¹³ C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 91 | 271 |
| Abbildung 279: | ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Ethylesters 101a | 271 |
| Abbildung 280: | ¹³ C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Ethylesters 101a | 272 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 281: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure 101b | 272 |
| Abbildung 282: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) der Säure 101b | 273 |
| Abbildung 283: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 102a | 273 |
| Abbildung 284: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 102a | 274 |
| Abbildung 285: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 102b | 274 |
| Abbildung 286: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 102b | 275 |
| Abbildung 287: LC-HRMS-Lauf des pcPNA ₁ -Strangs 193 ; violett: Massenspur, blau: UV-Chromatogramm (260 nm). | 275 |
| Abbildung 288: Massenverteilung im Bereich von 21.9 min bis 24.0 min des LC-HRMS-Lauf des pcPNA ₁ -Strangs 193 | 275 |
| Abbildung 289: Vergrößerte Darstellung des neutralen Spektrums des LC-HRMS-Laufs des pcPNA ₁ -Strangs 193 im Bereich von 21.9 min bis 24.0 min. | 276 |
| Abbildung 290: LC-HRMS-Lauf des pcPNA ₂ -Strangs 194 ; violett: Massenspur, blau: UV-Chromatogramm (260 nm). | 276 |
| Abbildung 291: Massenverteilung im Bereich von 23.1 min bis 26.1 min des LC-HRMS-Lauf des pcPNA ₂ -Strangs 194 | 276 |
| Abbildung 292: Vergrößerte Darstellung des neutralen Spektrums des LC-HRMS-Laufs des pcPNA ₂ -Strangs 194 im Bereich von 23.1 min bis 26.1 min. | 276 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Tabelle 1: Initiale Acylierungsraten der Substrate 57a,b und 58-63 mit der Psymberin KS 1, KS 2, KS 3 und Bacillaen KS 5 berechnet aus $\ln([KS]/[KS_0])$; <i>N.D.</i> : keine detektierbare Acylierung während der Inkubation; * SNAC-Thioester, der das putative natürliche Intermediat der KS imitiert; geschätzter Fehler: $\pm 0.005 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$ | 46 |
| Tabelle 2: Initiale Acylierungsraten der Bacillaen KS 1 mit den SNAC-Thioestern 64a-c , 65-71 ; <i>N.D.</i> : keine detektierbare Acylierung während der Inkubation; * SNAC-Thioester, der das natürliche Substrat imitiert, geschätzter Fehler: $\pm 0.005 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$ | 52 |
| Tabelle 3: Initiale Acylierungsraten der Bacillaen KS 2 mit den Substraten 59 , 62 , 67 , 68 , 72-75 ; <i>N.D.</i> : keine detektierbare Acylierung während der Inkubation; * SNAC-Thioester, der das natürliche Substrat imitiert, geschätzter Fehler: $\pm 0.005 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$ | 58 |
| Tabelle 4: Versuchte Reduktionsmethoden zur Synthese des Alkohols 179a | 70 |
| Tabelle 5: Gradientensystem für die LC-HRMS-Analyse und HPLC-Aufreinigung der pcPNA-Oligomere 193 , 194 | 169 |

Erläuterungen und Abkürzungen

Häufig genannte chemische Verbindungen sind im Text mit fett gedruckten arabischen Ziffern gekennzeichnet. Im Anhang befindet sich eine Ausklapptafel, in der die zugehörigen Strukturformeln zusammengefasst sind. Dieser Arbeit sind eine Zusammenfassung und ein Abstract in englischer Sprache vorangestellt, in der die Nummerierung von der im Hauptteil verwendeten Nummerierung abweicht. Deshalb wurden in diesen Abschnitten die Strukturen mit römischen Ziffern gekennzeichnet.

Literaturhinweise wurden mit hochgestellten arabischen Ziffern kenntlich gemacht. Das Literaturverzeichnis befindet sich am Ende der vorliegenden Arbeit und beinhaltet alle Literaturstellen.

Im experimentellen Teil werden die Kürzel CK-XXX verwendet, um auf die entsprechenden Versuchsnummern im Laborjournal zu verweisen. Die Zahl im Kürzel (XXX) entspricht der Seitenzahl im Laborjournal.

Folgende Abkürzungen wurden verwendet:

| | |
|---------------------|---|
| (3-Ncp)Ala: | 3-(<i>trans</i> -2-Nitrocyclopropyl)alanin |
| (4-Pe)Pro: | (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-(<i>Z</i> -Propenyl)prolin |
| (β -Me)Phe: | (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-3-Methylphenylalanin |
| A: | Adenin |
| AcOH: | Essigsäure |
| A-Domäne: | Adenylierungsdomäne |
| AL: | Acyl-[ACP]-Ligase |
| AMP: | Adenosinmonophosphat |
| ARCUT: | künstlicher DNA-Schneider (engl.: <u>a</u> r <u>t</u> ificial <u>r</u> estriction DNA <u>c</u> utter) |
| Asn: | Asparagin |
| AT: | Acyltransferase |
| α -Thr: | (<i>R</i>)- <i>allo</i> -Threonin |
| ATP: | Adenosintri-phosphat |
| Bn: | Benzyl |
| Boc: | <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl |
| Boc ₂ O: | Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat |
| bp: | Basenpaar |
| br: | broad (breit) |
| bzw.: | beziehungsweise |
| C: | Cytosin |
| c: | Konzentration (engl.: concentration) |

| | |
|--------------------|---|
| Cbz: | Benzyloxycarbonyl |
| Cbz-Cl: | Benzyloxycarbonylchlorid |
| CDI: | Carbonyldiimidazol |
| C-Domäne: | Kondensationsdomäne |
| Chpca: | 5-Chlor-1-hydroxypyrrol-2-carbonsäure |
| CoA: | Coenzym A |
| CR: | Crotonase |
| Cy: | Cyclase |
| Cys: | Cystein |
| D: | 2,6-Diaminopurin |
| d: | Dublett |
| DCC: | <i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid |
| DECA: | <i>N,N</i> -Diethylcyclohexylamin |
| DhbtOH: | 3,4-Dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazine |
| DIBAL-H: | Diisobutylaluminiumhydrid |
| DIEA: | Diisopropylethylamin |
| D _M : | 2,6-Diaminopurinmonomer |
| DMF: | <i>N,N</i> -Dimethylformamid |
| DMS: | Dimethylsulfid |
| DMSO: | Dimethylsulfoxid |
| dsDNA: | doppelsträngige DNA |
| E: | Epimerase |
| ECH: | Enoyl-CoA-Dehydratasen |
| EDC-HCl: | 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid |
| eq.: | Äquivalente |
| ER: | Enoylreduktase |
| ESI: | Elektronensprayionisierung (<u>e</u> lectron <u>s</u> pray <u>i</u> onization) |
| Et ₂ O: | Diethylether |
| Et ₃ N: | Triethylamin |
| EtOAc: | Essigsäureethylester |
| EtOH: | Ethanol |
| F: | Formylase |
| FAS: | Fettsäuren-Biosynthese |
| G: | Guanin |
| GNAT: | GCN5-verwandte <i>N</i> -Acetyltransferase |
| h: | Stunde |
| Hal: | Halogenase |
| HBTU: | 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluoro-phosphat |
| HGMS: | 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA |
| HOBt: | 1-Hydroxybenzotriazol |

| | |
|-----------------|--|
| HPLC: | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<u>h</u> igh <u>p</u> erformance <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography) |
| Hz: | Hertz |
| Ile: | <i>L</i> -Isoleucin |
| K: | Lysin |
| KHMDS: | Kaliumhexamethyldisilazan |
| KR: | Ketoreduktase |
| KS: | Ketosynthase |
| LC: | Flüssigkeitschromatographie |
| LM: | Lösungsmittel |
| M: | Molar |
| m: | Multiplet |
| MBHA: | 4-Methylbenzhydrylaminharz Hydrochlorid |
| <i>m</i> -CPBA: | <i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure (engl. <u>m</u> eta- <u>c</u> hlorper <u>b</u> enzoic <u>a</u> cid) |
| MeOH: | Methanol |
| MeOTf: | Methyltrifluormethansulfonat |
| min: | Minuten |
| Ms: | Mesyl |
| MS: | Massenspektrometrie |
| Ms-Cl: | Methansulfonylchlorid |
| MT: | Methyltransferase |
| NaOEt: | Natriumethanolat |
| <i>n</i> -BuLi: | <i>n</i> -Butyllithium |
| NMM: | <i>N</i> -Methylmorpholin |
| NMP: | <i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon |
| NMR: | Kernresonanzspektroskopie |
| NRPS: | Nicht-ribosomale Peptidsynthase |
| ORF: | Offener Leserahmen (engl. <u>o</u> pen- <u>r</u> eading- <u>f</u> rame) |
| Ox: | Oxidase |
| P: | Phosphoserin |
| PCC: | Pyridinium Chlorochromat |
| PCP: | Peptidyl-Carrierprotein |
| pcPNA: | Pseudo-complementary peptide nucleic acid |
| PDC: | Pyridiniumdichromat |
| PKS: | Polyketidsynthase |
| PMB: | <i>para</i> -Methoxybenzyl |
| PMB-Cl: | <i>para</i> -Methoxybenzylchlorid |
| PNA: | Peptidnukleinsäure |
| PPant: | 4'-Phosphopanthetintransferase |
| ppm: | parts per million |

| | |
|------------------|--|
| PPTase: | Phosphopantetheintransferase |
| PyBop: | (Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium Hexafluorophosphate |
| q: | Quartett |
| r.t.: | Raumtemperatur |
| R: | Reduktase |
| R _f : | Retentionsfaktor |
| s: | Singulett |
| SAM: | S-Adenosylmethionon |
| SNAC: | N-Acetylcysteamin |
| ssDNA: | einzelsträngige DNA |
| T: | Thymin |
| t: | Triplett |
| TBAF: | Tetrabutylammoniumfluorid |
| TBDPhSi-Cl: | <i>Tert</i> -Butyldiphenylchlorsilan |
| TBS-Cl: | <i>Tert</i> -Butyldimethylchlorsilan |
| TE: | Thioesterase |
| TFA: | Trifluoressigsäure (engl. <u>T</u> ri <u>f</u> luoro <u>a</u> ctic <u>a</u> cid) |
| TFMS: | Trifluormethansulfonsäure |
| THF: | Tetrahydrofuran |
| TMS-Cl: | Trimethylsilylchlorid |
| Ts-Cl: | <i>p</i> -Toluolsulfonsäurechlorid |
| ü/N: | über Nacht |
| U _s : | Thiouracil |
| U _s : | 2-Thiouracil-Monomer |
| ÜZ | Übergangszustand |
| vgl.: | vergleich |
| z.B.: | zum Beispiel |

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Substratspezifität verschiedener *trans*-AT Ketosynthasen untersucht und Oligomere für das ARCUT-basierte Schneiden der Psymberin-DNA synthetisiert. Weiterhin wurden Substrate für die Aufklärung der Misakinolid-Biosynthese und *cis*-4-Propenylprolin für die Analyse der Hormaomycin-Biosynthese hergestellt.

Viele medizinisch relevante Naturstoffe wie, Erythromycin A (I), werden von modularen Typ I Polyketidsynthasen (PKS) gebildet (Abbildung I). Dabei inkorporiert im Allgemeinen jedes Modul über eine Claisen-artige Kondensation einen Acylbaustein in eine wachsende Polyketidkette und reicht den verlängerten Metaboliten zum nachfolgenden Modul weiter. Die Biosynthese des Antibiotikums I wurde unter anderem von Khosla *et al.* und Staunton *et al.* eingehend untersucht, und anhand dieser „Lehrbuch-PKS“ wurde das Colinearitätsprinzip aufgestellt. Mit diesem ist es möglich von der Architektur der PKS auf die Struktur des produzierten Polyketids zu schließen. Ebenso kann bei bekannter Struktur des Naturstoffes der modulare Aufbau der PKS vorhergesagt werden. Jedoch wurde in den letzten Jahren gezeigt, dass eine weitere Gruppe innerhalb der Typ-I-PKS existiert, für die das Colinearitätsprinzip meistens nicht zutrifft. Bei diesen sogenannten *trans*-AT-PKS sind die Acyltransferasen (AT) nicht als Domänen in die Module integriert, sondern sind freistehende Proteine, die mit den PKS-Modulen interagieren. *Trans*-AT-PKS haben sich evolutiv unabhängig von den „Standard“-(*cis*-AT)-PKS entwickelt und zeichnen sich, neben den alleinstehenden AT, durch eine ungewöhnliche Architektur der Module aus. Die Funktion der Module oder einzelner Domänen innerhalb dieser ist bisher nur schlecht verstanden. Sowohl Psymberin (II), als auch Bacillaen (III) wurden als Produkte einer *trans*-AT-PKS identifiziert. Dabei wurden für die Biosynthese des Antibiotikums (III) in Studien von Piel *et al.* fast alle Biosyntheseschritte aufgeklärt. Die Untersuchung von *trans*-AT-PKS ist von großem Interesse, da viele der produzierten Polyketide von pharmakologischem Interesse sind.

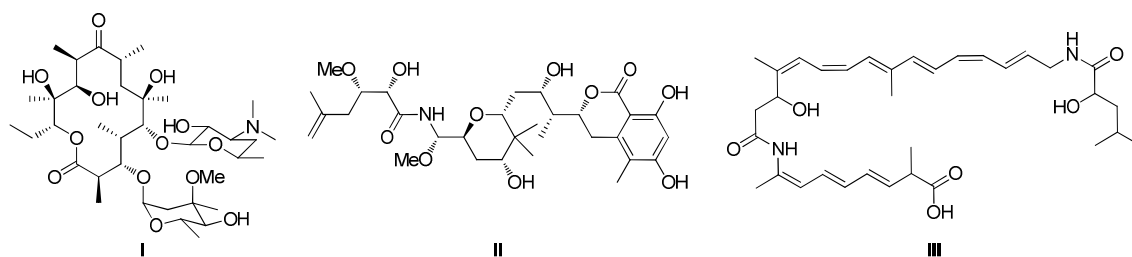


Abbildung I: Erythromycin A (I), Pederin (II) und Bacillaen (III).

Innerhalb der PKS katalysieren Ketosynthasen (KS) die Claisen-Kondensationsreaktion zwischen der wachsenden Polyketidkette und dem Verlängerungsbaustein. Interessanterweise zeigte eine phylogenetische Analyse von Piel *et al.*, dass die Gensequenzen der KS mit den Strukturen der jeweilig prozessierten Intermediate korrelieren. Anhand dieser Sequenzkorrelation scheint es möglich zu sein ein Regelwerk zur Vorhersage von Strukturen aus *trans*-AT-PKS ähnlich dem Colinearitätsprinzip zu erstellen. Bislang basiert das postulierte Prinzip jedoch ausschließlich auf *In-silico*-Daten. In der vorliegenden Arbeit sollte die Substratspezifität erstmals experimentell untersucht und validiert werden. Für die Analyse wurde eine neue *In-vitro*-Methode entwickelt, mit der eine schnelle und zuverlässige Aussage über KS-Spezifitäten möglich ist. Nach der Proteinexpression einzelner KS-Domänen wurden diese mit synthetisierten *N*-Acetylcysteamin-Substraten (SNAC-Substrate) inkubiert und die resultierende Acylierung der Proteine mittels Massenspektrometrie analysiert. Die KS-Domänen wurden von Annette Kampa aus der AG Piel exprimiert und die Inkubationsversuche in einer Kooperation mit Matthew Jenner aus den AG Oldham an der Universität Nottingham (UK) durchgeführt. Für einen Proof-of-Principle wurden die erste, zweite und dritte KS (KS 1, KS 2, KS 3) aus der Psymberin-PKS, sowie die fünfte KS (KS 5) aus der Bacillaen-PKS untersucht (Abbildung II). Anhand der phylogenetischen Analyse wurde vorhergesagt, dass die Substratspezifität nur bis zur β -Position nach der Thioesterbindung stark ausgeprägt ist. In dem Proof-of-Principle wurden daher kurzkettige Substrate mit Modifikationen in α - β -Position getestet. In den Inkubationsassays wurde tatsächlich eine Substratspezifität in *trans*-AT-KS nachgewiesen, die in verschiedenen KS unterschiedlich stark ausgeprägt ist.

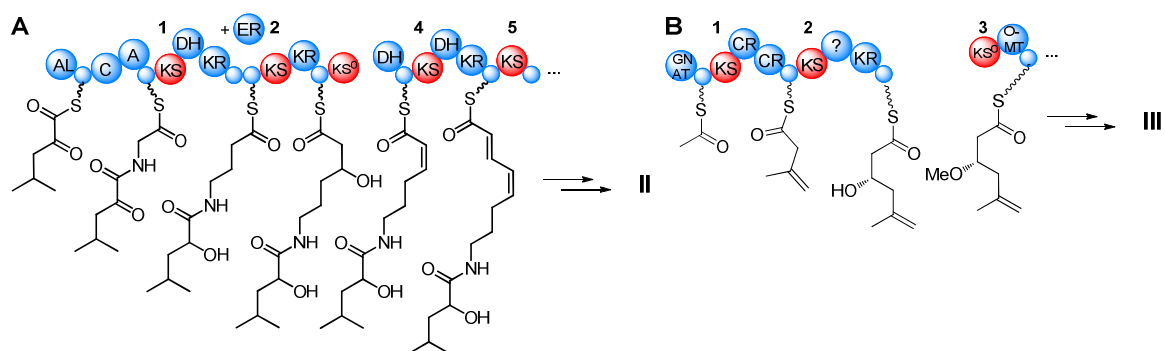


Abbildung II: **A)** Ausschnitt aus der Bacillaen-Biosynthese, **B)** Ausschnitt aus der Psymberin-Biosynthese, rot: untersuchte KS; AL: Acyl-[ACP]-Ligase, C: Kondensationsdomäne, A: Adenylierungsdomäne, DH: Dehydratase, KR: Ketoreduktase, ER: Enoylreduktase, GNAT: GCN5-verwandte *N*-Acetyltransferase, CR: Crotonase, O-MT: O-Methyltransferase.

Nach dem Proof-of-Principle wurden für weitere Studien die Bacillaen KS 1, KS 2, KS 4 ausgewählt, da diese in für die kombinatorische Biosynthese interessanten Modulen der PKS lokalisiert sind. Für die Studien wurden für die jeweilige KS SNAC-Analoga des entsprechenden natürlichen Substrats synthetisiert (Abbildung III). Dabei wurden sowohl Volllängensubstrate (**IVa-d**, **VIIIa-d**), als auch verkürzte Substrate (**Va-b**, **Vla-d**, **VIIa-d**) hergestellt. Die Synthese der Thioester **IVa-d**, **Va-b**, **Vla-d** für Untersuchung der KS 1 erfolgte unter Standard-Peptidkupplungsverfahren. Die Inkubationsassays der KS 1 mit den Substraten **IVa-d**, **Va-b**, **Vla-d** zeigte eine ausgeprägte Substratspezifität der KS 1 bezüglich der α -Position: der das natürliche Intermediat imitierende Thioester **IVa** wurde bevorzugt acyliert. Das Alanin-Analogon **IVb** wurde in wesentlichen schlechteren Raten akzeptiert, wohingegen für die sterisch anspruchsvollen Substrate **IVc**, **Va-b** keine Acylierung beobachtet wurde. Mit der Testung der Thioester **Vla-d** wurde gezeigt, dass die NH-Gruppe der Amidfunktion die Substratspezifität der KS 1 signifikant beeinflusst. Vermutlich beeinflussen NH-Interaktionen mit Aminosäuren in der Nähe des aktiven Zentrums des Proteins die Acylierung. Der Vergleich der Acylierungsraten von Substrat **IVd** und **IVa** ergab keine neuen Erkenntnisse zum Oxidationsgrad der δ -Position im natürlichen Substrat.

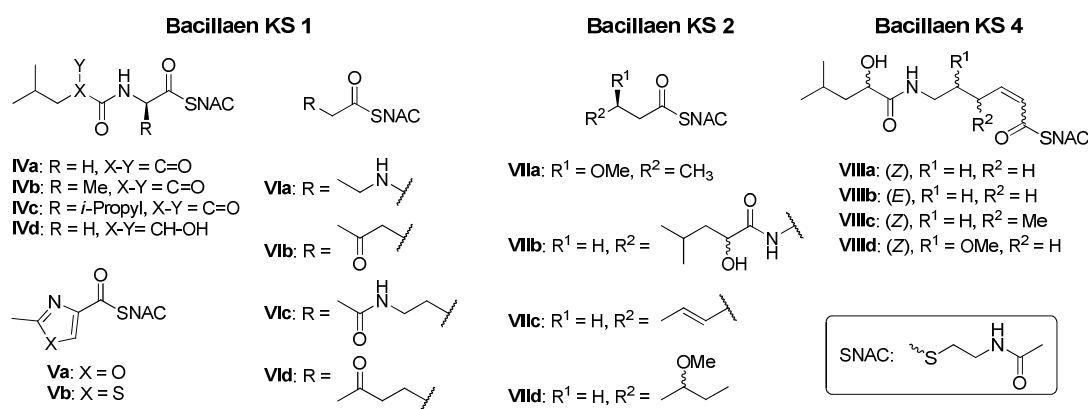


Abbildung III: SNAC-Thioester **IVa-d**, **Va-b**, **VIa-d**, **VIIa-d**, **VIIla-d** für Untersuchung der Bacillaen KS 1-, KS 2- und KS 4-Substratspezifität.

Anhand der Inkubation der KS 2 mit den SNAC-Analoga **VIIa-d** wurde die Substratspezifität in γ,δ -Position untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass distal der β -Position die Spezifität relaxiert. Die Thioester **VIIc-d**, **VIIb-c** wurden in vergleichbaren Raten acyliert. Interessanterweise wurde für das natürliche Analogon **VIIa**, vermutlich aufgrund einer Substratdimerisierung, keine Acylierung detektiert. Durch den Proteinassay mit dem SNAC-Substrat **VIIa** wurde gezeigt, dass die KS 2 bis zur β -Position spezifisch agiert. Das Substrat **VIIa** wurde nicht akzeptiert.

Die KS 4 prozessiert ein *cis*-konfiguriertes, α,β -ungesättigtes Substrat. Für die Untersuchung der Substratspezifität wurden die Thioester **VIIIa-d** synthetisiert. Bislang wurde die KS 4 noch nicht erfolgreich exprimiert, sodass die Substratspezifität erst in folgenden Studien untersucht werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde die vorhergesagte Substratspezifität in *trans*-AT-PKS zum ersten Mal *in vitro* bestätigt. Die Studien belegten eindrucksvoll, dass die Spezifität wie postuliert bis zur β -Position stark ausgeprägt ist und danach nachweislich abfällt. Aufbauend auf diesen Ergebnissen sollte es in Zukunft einfacher sein, neue *trans*-AT-Cluster zu analysieren. Auch im Hinblick auf die kombinatorische Biosynthese wurden mit den Ergebnissen wichtige Erkenntnisse gewonnen, die die Chancen für erfolgreiche Generierung artifizieller Polyketide verbessern.

In einem weiteren Teilprojekt der Arbeit wurden Substrate zur Analyse der Biosynthese des *trans*-AT-Polyketids Misakinolid A (**IX**) synthetisiert. In vorangegangenen Studien von Dr. Agustinus Uria aus der AG Piel wurde über einen metagenomischen Ansatz die Biosynthese des Naturstoffes **IX** untersucht und ein Biosyntheseweg vorhergesagt. Anhand der Analyse wurde postuliert, dass eine Pyransynthase (PS) in Modul 15 integriert ist, die eine intramolekulare Michael-Addition katalysiert (Abbildung IV). Um diese Hypothese zu verifizieren, sollte die Substratspezifität der KS 16 untersucht werden. Dafür wurde sowohl das Pyransubstrat **X**, als auch der offenkettige Thioester **XI** synthetisiert. Die Domäne wurde bislang noch nicht exprimiert, sodass erst nach erfolgreicher Proteinproduktion in einer Folgestudie die Spezifität untersucht werden kann.

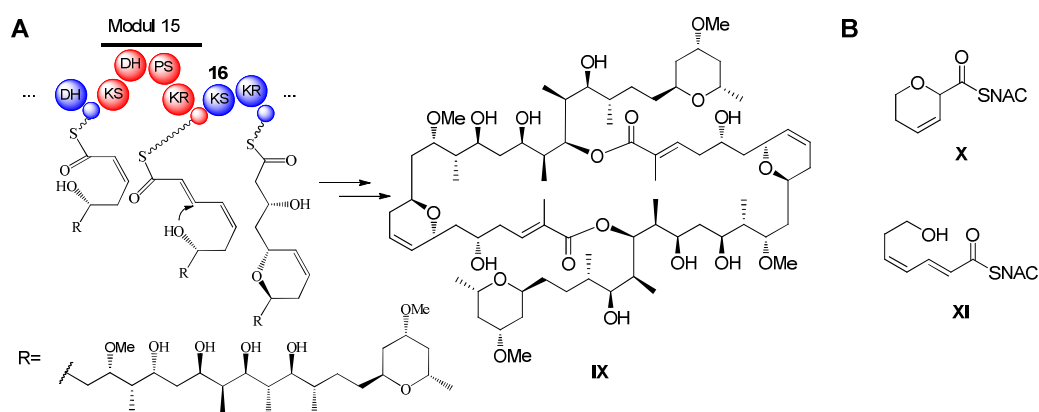


Abbildung IV: **A)** Ausschnitt aus der Biosynthese von Misakinolid A (**IX**), **B)** Substrate **X**, **XI** für die Analyse der Substratspezifität der Misakinolid KS 16.

Ein weiteres Projekt der vorliegenden Arbeit war die Synthese von *cis*-4-Propenylprolin (**XIII**). Für die Analyse der Biosynthese des Hormaomycins (**XII**)

wurde der Peptidbaustein **XIII** entsprechend der literaturbekannten Synthese hergestellt (Abbildung V). In Arbeiten von Dr. Max Crüsemann und Xiaofeng Cai aus der AG Piel wurden durch Fütterungsexperimente mit dem im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Prolinderivat **XIII** zum einem ein Regulatorgen für die Biosynthese des Bausteins **XIII** entdeckt. Zum anderen wurde gezeigt, dass die das Prolin **XIII** prozessierende Adenylierungsdomäne substratspezifisch agiert.

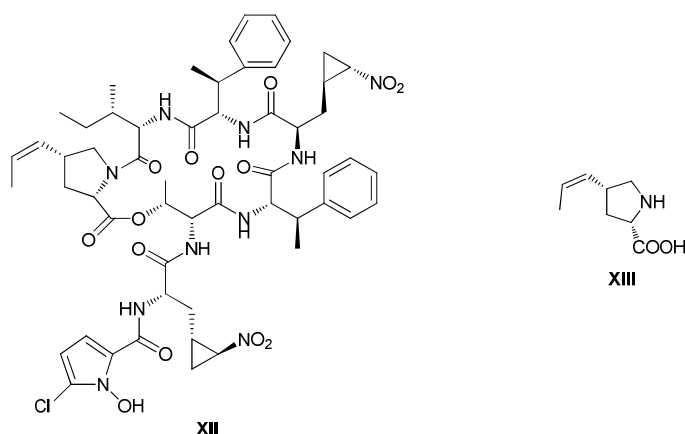


Abbildung V: Hormaomycin (**XII**) und *cis*-4-Propenylprolin (**XIII**)

Im letzten Teilprojekt der vorliegenden Arbeit wurden Oligomere für ein hochspezifisches Schneiden der Psymberin-DNA synthetisiert. Das anti-kanzerogen wirkende Psymberin (**II**) ist in seinem Wirt in sehr geringem Titer enthalten. Der genaue Produzent von **II** wurde bislang noch nicht ermittelt, und der Schwamm, aus dem **II** isoliert wurde, ist mit dem jetzigen Stand der Technik nicht kultivierbar, sodass über eine heterologe Expression der Psymberin-produzierenden Gene die Bioverfügbarkeit des Polyketids **II** verbessert werden sollte. Für diese Experimente ist es notwendig die Psymberin-DNA an einer definierten Stelle zu schneiden. Das ARCUT-System (künstlicher DNA-Schneider, engl.: artificial restriction DNA cutter) bietet die Möglichkeit einer hochspezifischen DNA-Spaltung an einer ausgewählten Stelle. Die für die ARCUT-vermittelte DNA-Spaltung benötigten Oligomere **XIV**, **XV** wurden über modifizierte Merrifield-Festphasensynthese hergestellt (Abbildung VI). In Folgearbeiten sollte die Psymberin-DNA mittels ARCUT selektiv gespalten werden können.

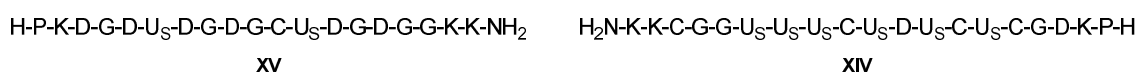


Abbildung VI: Oligomere **XIV** und **XV** für das ARCUT-System; K: Lysin, C: Cytosin, G: Guanin, U_S: 2-Thiouracil, D: 2,6-Diaminopurin, P: Phosphoserin.

Abstract

Presented here is the investigation of substrate specificity in different *trans*-AT ketosynthases, as well as the synthesis of oligomers for the restriction enzyme-independent ARCUT-based DNA cutting system for manipulation of the psymberin biosynthetic gene cluster. Furthermore the synthesis of compounds for the analysis of misakinolide A biosynthesis and of *cis*-4-propenylproline biosynthesis in hormaomycin biogenesis are also described.

Many medicinally relevant natural products, like erythromycin A (**I**), are produced by modular type I polyketide synthases (PKSs) (figure I). Typically one module incorporates one acyl building block via a Claisen-like condensation reaction into the growing polyketide chain and transfers the elongated metabolite to the proceeding downstream module. The biosynthesis of **I** was extensively studied and based on this work the “textbook-PKS” colinearity principle was postulated. This rule stipulates that sequential PKS architecture directly correlates to the predicted structure of the produced polyketide. *Vice versa*, it is also possible to predict the module arrangement and composition of the producing PKS from the chemical structure of a natural product. However, in recent years it was shown that there exists another group within type I PKSs where the colinearity principle does not apply in most cases. Within these so called *trans*-AT-PKSs, the acyltransferases (AT) are not integrated as domains into the PKS modules, but are stand-alone proteins that interact *in trans* with PKS modules. *Trans*-AT-PKSs have been proposed to develop evolutionarily independent from the “standard”-(*cis*-AT)-PKSs and are characterized, besides the stand-alone ATs, by unusual module architectures. The function of the modules or domains within is largely unknown. Both psymberin (**II**) and bacillaene (**III**) were identified as products of a *trans*-AT-PKS. Furthermore, almost all the biosynthetic steps of bacillaene production have been elucidated. The investigation of *trans*-AT-PKSs is of great importance, since many of these polyketides are of pharmaceutical interest.

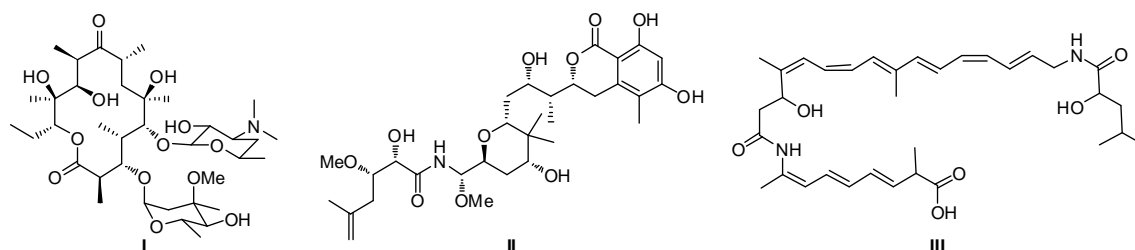


Figure I: Erythromycin A (**I**), psymberin (**II**) and bacillaene (**III**).

Within PKSs, ketosynthases (KS) catalyze the decarboxylative Claisen condensation between the growing polyketide chain and the elongation unit. Interestingly, a phylogenetic analysis by Piel *et al.* revealed that the gene sequence of KS in *trans*-AT PKSs correlates with the structure of the two-carbon unit of the previously processed intermediate. By taking advantage of this sequence correlation, it seems possible to develop basic rules for structure prediction of *trans*-AT-PKS similar to the colinearity principle. However, this postulated principle is currently based only on *in silico* data. In this thesis the substrate specificities of selected KS domains from *trans*-AT-PKSs have been experimentally investigated and validated. For the analysis, a new *in vitro* method was established that allows for fast and reliable data concerning KS specificity. After heterologous expression of an individual KS domain, the protein was incubated with synthesized *N*-acetylcysteamine (SNAC) substrates and the resulting acylation of the protein was analyzed by mass spectrometry (MS). Through collaboration, synthesized SNAC substrates (Christoph Kohlhaas, AG Piel) and heterologously expressed KS domains (Annette Kampa, AG Piel) were incubated and analyzed by MS (Matthew Jenner, AG Oldham). For proof of principle, the first, second and third KSs (KS 1, KS 2, KS 3) of the PKS in psymberin biosynthesis, as well as the fifth KS (KS 5) in bacillaene biosynthesis were investigated (figure II). Phylogenetic analysis predicts strong substrate specificity as far as the β -position from the thioester bond. Hence, truncated substrates with modifications in the α,β -position were tested. The assays demonstrated different levels of substrate specificity in each of the *trans*-AT-PKS KS domains.

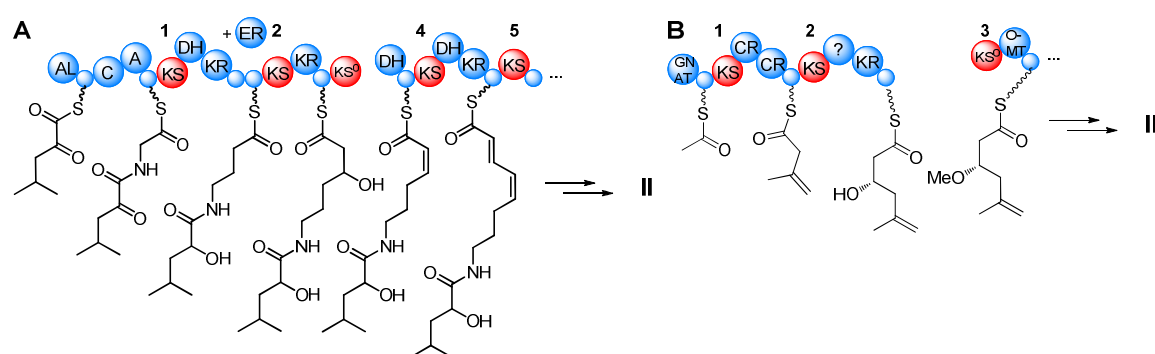


Figure II: **A)** the first PKS modules in bacillaene biosynthesis, **B)** the first PKS modules in psymberin biosynthesis, red: analyzed KSs. AL: acyl-[ACP] ligase, C: condensation domain, A: adenylation domain, DH: dehydratase, KR: ketoreductase, ER: enoylreductase, GNAT: GCN5 related *N*-acetyltransferase, CR: crotonase, O-MT: O-methyltransferase.

For further studies, the bacillaene KS 1, KS 2, and KS 4 were selected, since they are located in interesting modules of the PKS with regard to combinatorial biosynthesis. For the investigations of the particular KSs, SNAC analogs were synthesized according to the structures of the proposed natural intermediates (figure III). Resultingly, full-length

substrates (**Iva-d**, **VIIa-d**) as well as shortened compounds (**Va-b**, **Vla-d**, **VIIa-d**) were made. The synthesis of thioesters **Iva-d**, **Va-b**, and **Vla-d** were performed via standard peptide coupling procedures. Incubation of KS 1 with compounds **Iva-d**, **Va-b**, or **Vla-d** showed a distinct substrate specificity related to the α -position: thioester **Iva** imitating the natural intermediate was preferentially acylated. The alanine analog **Ivb** was accepted at considerably lower rates, whereas no acylation was detected with the sterically demanding substrates **Ivc** and **Va-b**. The assays with compounds **Vla-d** showed that the NH of the amide function is of great importance for KS 1 substrate specificity. Presumably hydrogen bonding with the amide in or near the active site of the KS affects acylation efficiency. Comparison of the acylation rates of substrates **Ivd** and **Iva** did not deliver additional insight into the preferred oxidation state of the δ -position of the natural intermediate.

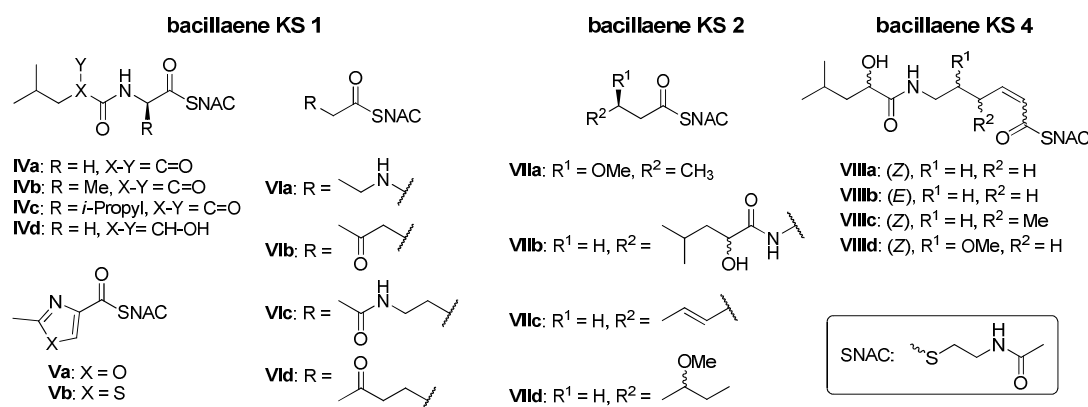


Figure III: SNAC-thioesters **Iva-d**, **Va-b**, **Vla-d**, **VIIa-d**, **VIIa-d** for the investigation of bacillaene KS 1, KS 2, KS 3 and KS 4 substrate specificity.

On the basis of **VIIa-d** incubations with KS 2, the substrate specificity at the γ,δ -position was investigated. The results showed that specificity relaxes distal to the β -position. All tested thioesters (**VIIc-d** and **VIIb-c**) were acylated at comparable rates. Interestingly no acylation was observed for the natural analog **VIIa**, which is probably due to substrate dimerization. Reaction with substrate **VIIa** revealed that KS 2 operates with specificity up to the β -position since **VIIa** wasn't accepted by the domain.

KS 4 is proposed to process a *cis*-configured, α,β -unsaturated intermediate. For the investigation of its substrate specificity, thioesters **VIIa-d** were synthesized. So far KS 4 was not successfully expressed, therefore the specificity of this domain will be elucidated in future studies.

In this thesis the predicted substrate specificities in *trans*-AT-PKSs were tested *in vitro* for the first time. These studies demonstrate that, as predicted, substrate specificity strongly correlates to the proposed intermediate structure through the β -position but relaxes significantly beyond that point. Based on these insights it should be easier to functionally verify and analyze new *trans*-AT PKS gene clusters in the future. With regard to combinatorial biosynthesis the results gave important perspectives that enhance chances for successful generation of engineered polyketides.

In a related project, compounds for the analysis of the *trans*-AT PKS misakinolide A (**IX**) were synthesized. In previous studies Dr. Agustinus Uria (AG Piel) used a metagenomic approach to investigate the biosynthesis of **IX** and predict a biosynthetic pathway. Based on these results it was postulated that a pyran synthase (PS) domain is integrated into module 15, which is proposed to catalyze an intramolecular conjugate addition (figure IV). To verify this hypothesis, the substrate specificity of the downstream KS 16 should be analyzed. For these experiments the pyran substrate **X** as well as the open-chained thioester **XI** were synthesized. Unfortunately, KS 16 has yet to be successfully expressed and purified and thus awaits investigation in future studies.

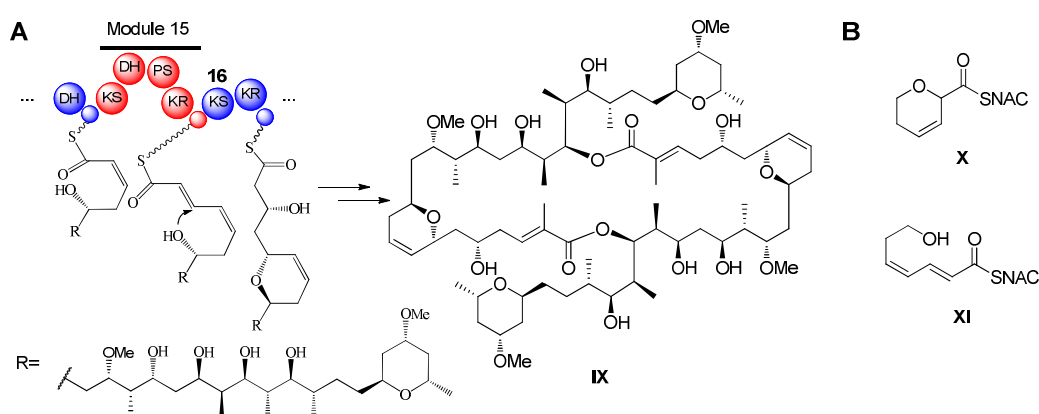


Figure IV: **A)** Select PKS modules from misakinolide A biosynthesis, **B)** compounds **X** and **XI** for substrate specificity analysis of misakinolide KS 16.

A further project of this thesis was the synthesis of *cis*-4-propenylproline (**XIII**). For the investigation of hormaomycin (**XII**) biosynthesis, the peptide building block **XIII** was synthesized according to the literature (figure V). Xiaofeng Cai (AG Piel) discovered through feeding experiments with **XIII** a regulatory gene involved in the biosynthesis of **XIII**. Additionally it was shown by Dr. Max Crüsemann (AG Piel) that the adenylation domain proposed to activate **XIII** in hormaomycin biosynthesis has high substrate specificity for **XIII**.

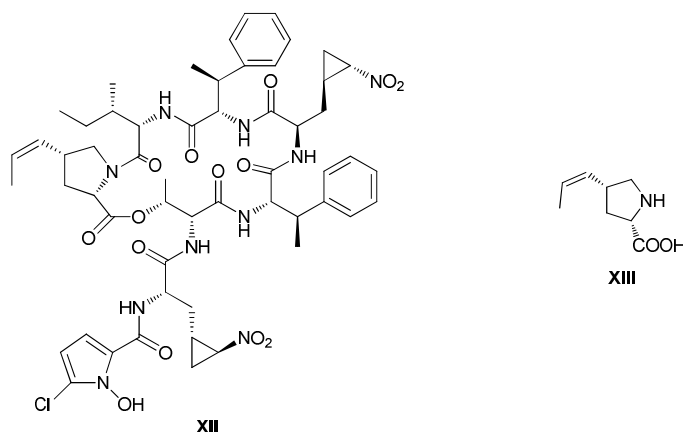


Figure V: Hormaomycin (**XII**) and *cis*-4-propenylproline (**XIII**).

The last project of this thesis involves the synthesis of oligomers for a site-selective cutting technique for targeting of the psymberin (**II**) gene cluster. The anti-tumor compound **II** is obtained from the sponge very poor titers. Currently, the psymberin producer has not been identified and the marine sponge from where it was isolated from is not yet cultivable. Heterologous expression of the psymberin-producing genes would create a renewable source for **II** with possibly improved production titers. For these experiments it is necessary to cut the psymberin DNA -almost 80 kilobases in length- at precisely defined positions. The ARCUT system (artificial restriction DNA cutter) provides the potential for this site selectivity without the use of restriction enzymes that do not have the necessary sequence specificity or positional flexibility. The required oligomers **XIV** and **XV** for ARCUT-mediated cleavage were successfully synthesized by modified Merrifield solid phase synthesis (figure VI). In follow-up experiments the ARCUT system will be used to successfully manipulate the psymberin gene cluster.

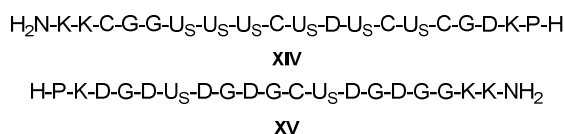


Figure VI: Oligomers **XV** and **XVI** for the ARCUT system. K: lysine, C: cytosine, G: guanine, U_S: 2-thiouracil, D: 2,6-diaminopurine, P: phosphoserine.

1 Einleitung

Die Bevölkerung, besonders die der Industriestaaten, verlässt sich bei der Versorgung mit Arzneimitteln auf die pharmazeutische Industrie.¹ Beispielsweise steht für die Behandlung von banalen bis hin zu lebensbedrohlichen bakteriellen Infekten eine Reihe von Antibiotika zur Verfügung. Mit der Einführung der ersten Antibiotika zwischen 1935 und 1949 wie Prontosil (1), Penicillin G (2) oder Tetracyclin (3) wurde die Mortalitätsrate bei Infektionen drastisch gesenkt (Abbildung 1). In den frühen 1970er Jahren wurde das Angebot an Antibiotika als ausreichend angesehen, und die Pharmaindustrie verlagerte ihre Forschung auf lukrativere Gebiete.² Neue Langzeittherapeutika gegen Hypertonie oder Demenz sind aufgrund der jahrelangen Applikation gewinnbringender als neue Antibiotika, die nur in Kurzzeittherapien Anwendung finden. Doch durch unsachgemäßen Einsatz von Antibiotika, kombiniert mit mangelnder Hygiene und verstärkt durch weltweites Reisen zeigen pathogene Bakterien vermehrt Resistenzen gegenüber den etablierten Wirkstoffen auf.^{1,3,4} Mittlerweile sind global gesehen bakterielle Infektionen die zweithäufigste Todesursache. Ehemals als Reserveantibiotika deklarierte Wirkstoffe, wie Vancomycin (4), müssen mittlerweile in der Ersttherapie eingesetzt werden, da Standardtherapien aufgrund von Resistenzbildungen versagen.⁴ Zusätzlich zeigen mehr und mehr Keime auch Resistenzen gegenüber den vormaligen Reserveantibiotika was die Problematik zusätzlich verschärft.⁵ „Our grandparents lived during an age without antibiotics. So could many of our grandchildren.“ warnte schon die Weltgesundheitsorganisation (engl.: World Health Organization, kurz: WHO) in ihrem Bericht über Infektionskrankheiten im Jahr 2000.⁶

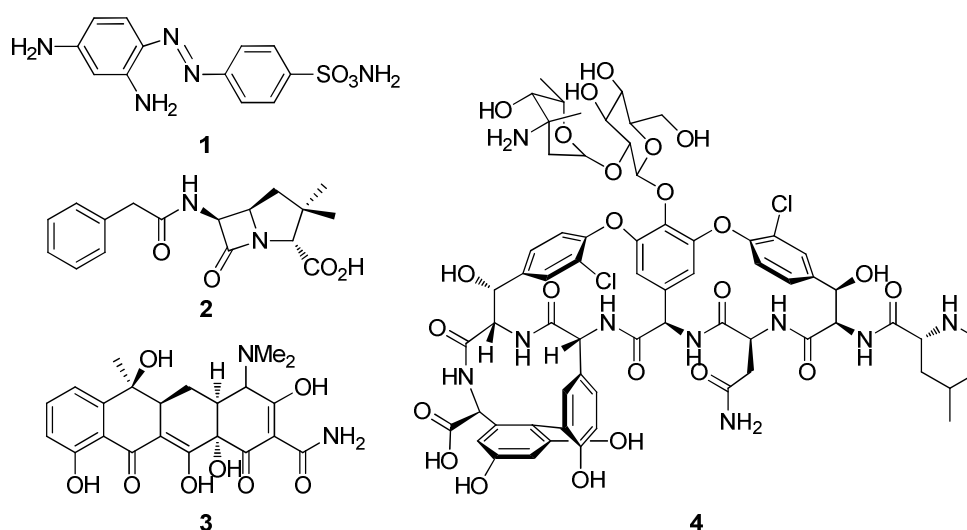


Abbildung 1: Prontosil (1), Penicillin G (2), Tetracyclin (3) und Vancomycin (4).

Obwohl nur ein Prozent aller bekannten organischen Verbindungen Naturstoffe sind, beruhte ein Drittel der Arzneimittelumsätze von 1981 bis 2004 auf Naturstoffen oder deren Derivaten.⁷ Mittlerweile sind mehr als eine Million Naturstoffe bekannt, von denen 20-25% eine Aktivität aufweisen, die pharmazeutisch oder industriell potentiell interessant ist. Naturstoffe werden dabei von Pilzen, Pflanzen und Mikroorganismen vor allem durch den Sekundärmetabolismus produziert.⁸ Solche sogenannten Sekundärmetabolite werden vom Organismus nicht unter allen Umständen gebildet und die biologische Funktion der Substanzen für den Produzenten ist oft unbekannt.⁹ Sie können beispielsweise zur Kommunikation dienen, oder bieten einen Wachstumsvorteil unter limitierten Nährstoffbedingungen. Jedoch sind die meisten der pharmakologisch relevanten Verbindungen Sekundärmetabolite. Beispielsweise werden Tetracyclin (**3**) durch eine Polyketidsynthese (PKS) (siehe Abschnitt 1.1) und Vancomycin (**4**) (siehe Abschnitt 1.2) durch eine nicht-ribosomale Peptidsynthetase (NRPS) im Sekundärmetabolismus von Bakterien produziert.

1.1 Polyketidsynthesen und Polyketide

Polyketidsynthesen (PKS) bilden eine große Familie aus multifunktionalen Enzymkomplexen, die die Bildung von Sekundärmetaboliten katalysieren.¹⁰ Die erzeugten Polyketide zeigen häufig biologische Aktivität und zeichnen sich durch strukturelle Diversität aus.¹¹ Die faszinierende Vielfalt der Polyketide reicht von Polyethern, -enen oder -phenolen, über Makrolide bis hin zu Endiinen. In der Medizin finden Polyketide vor allem Anwendung als Antibiotika (Tetracyclin (**3**), Erythromycin (**5**)) und Zytostatika (Epothilon B (**6**), Doxorubicin (**7**)) (Abbildung 2). Aber auch antiparasitäre, Cholesterinspiegel senkende oder immunsupprimierende Wirkung wurde für manche Polyketide nachgewiesen.¹¹

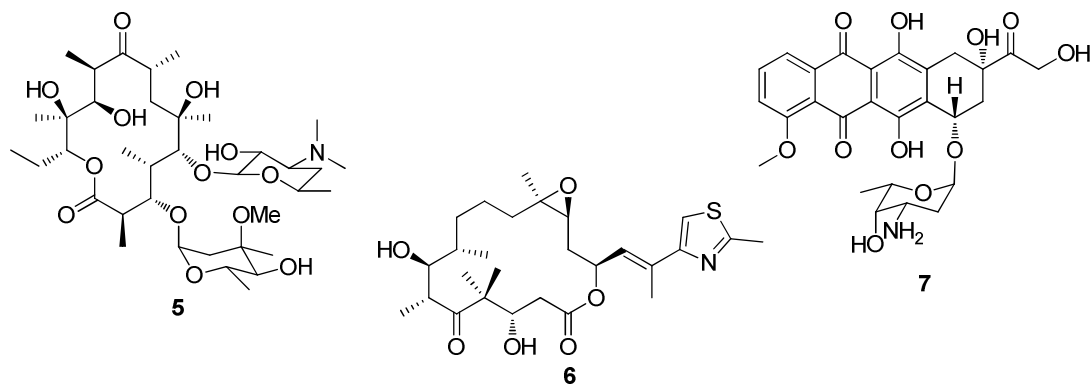


Abbildung 2: Klinisch relevante Polyketide Erythromycin (**5**), Epothilon (**6**) und Doxorubicin (**7**).

1.1.1 Biosynthese von Polyketiden

Trotz der strukturell breiten Diversität innerhalb der Naturstoffgruppe der Polyketide, liegt allen ein gemeinsamer Biosyntheseweg zu Grunde.¹² Die Polyketidbiosynthese ist sowohl biochemisch, als auch evolutionär mit der Synthese von Fettsäuren durch die Fettsäuresynthetase (engl.: Fatty Acid Synthetase, kurz: FAS) verwandt.^{10,11} In beiden Fällen werden die Ketten durch eine decarboxylierende Claisen-Thioester-Kondensation verlängert.

Zunächst wird eine Acyl-Startereinheit **8** mit Coenzym A (**11**), unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP, **9**), zum Acyl-CoA Derivat **12** aktiviert (Abbildung 3 A).¹³ Während bei der FAS ausschließlich Acetyl-CoA **13** und Malonyl-CoA **14** als Substrate prozessiert werden, ist die PKS flexibler bei der Substratakzeptanz (Abbildung 3 B). Neben den FAS-Substraten **13** und **14** tolerieren PKS auch die Bausteine **15-19** (Abbildung 3 C).¹⁴

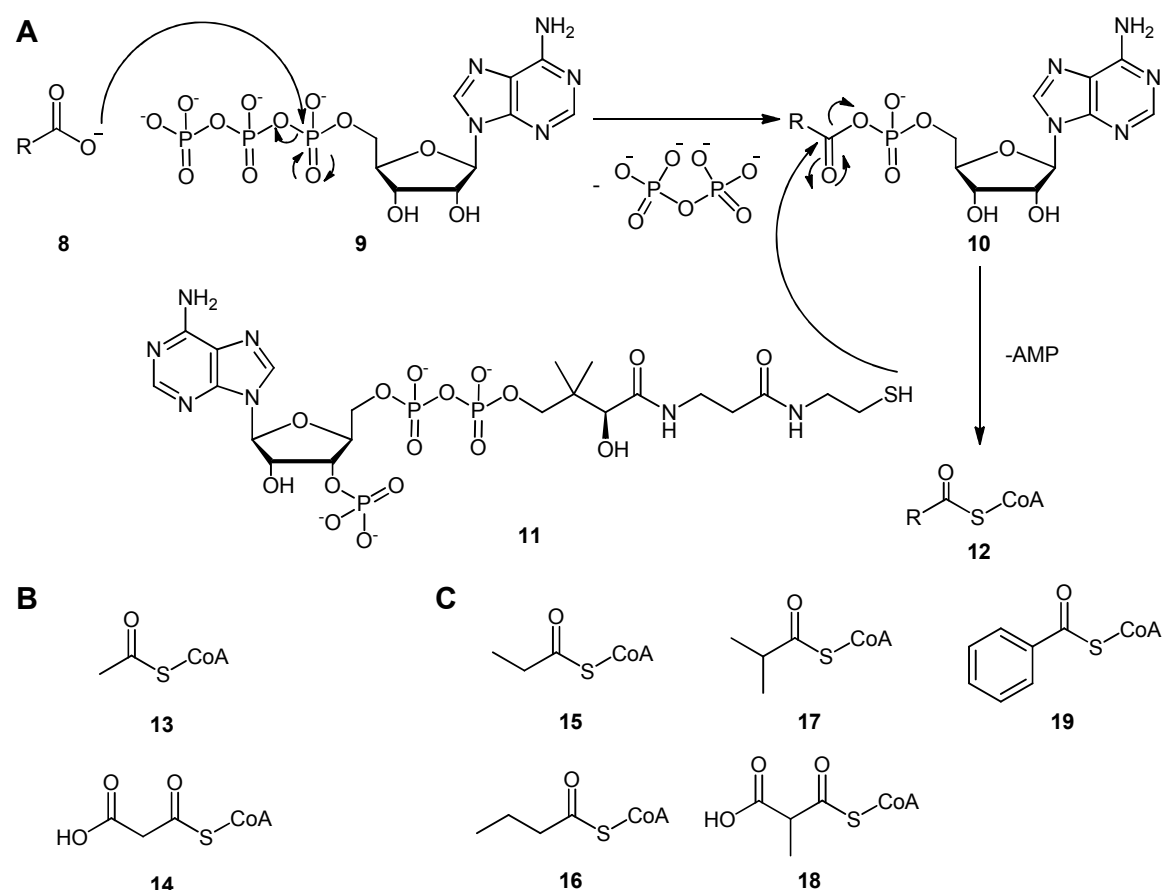


Abbildung 3: A) Mechanismus der Aktivierung des Acyl-Bausteins **8** zum Acyl-CoA Derivat **12**; B) Verwendete Substrate **13**, **14** der PKS und FAS; C) Weitere Bausteine **15-19**, die in PKS verwendet werden.¹⁴

Die aktivierten Bausteine sind während der Biosynthese kovalent über eine Thioesterbrücke mittels eines 4'-Phosphopantethein-Linkers (PPant) an ein aktiviertes Acylträgerprotein (engl.: Acylcarrierprotein, kurz: ACP) gebunden (Abbildung 4). Dafür wird zunächst der PPant-Rest in einer posttranslationalen Modifikation auf einen konservierten Serinrest des ACP übertragen. Die Übertragung des PPant-Linkers von Coenzym A (**11**) auf die inaktive *apo*-ACP führt zur aktivierten *holo*-ACP. Katalysiert wird der Prozess durch eine Phosphopantetheinyltransferase (PPTase).^{15,16}

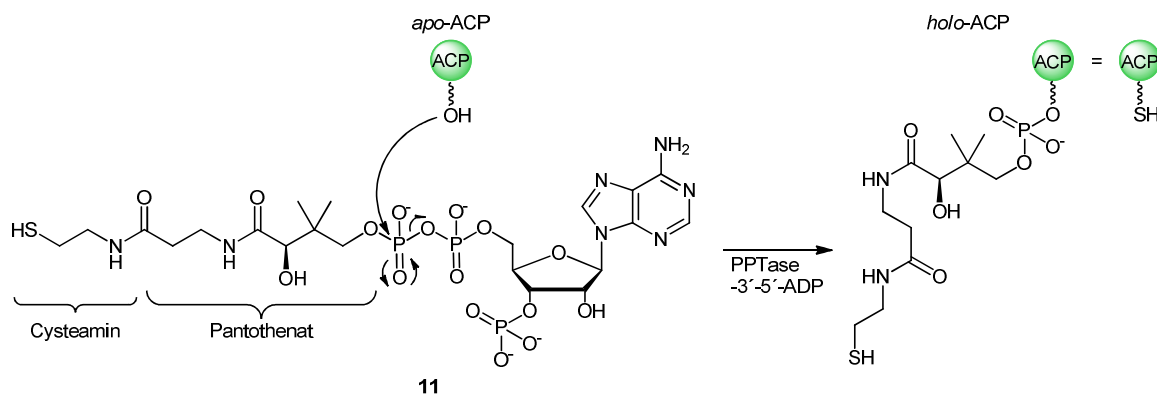


Abbildung 4: Aktivierung des *apo*-ACP zum *holo*-ACP mittels einer PPTase.

Eine Acyltransferase (AT) überträgt sowohl die Starter-, als auch die Elongationseinheit auf aktivierte *holo*-ACPs (Abbildung 5 A). Das mit der Startereinheit beladene ACP (ACP_1 , Abbildung 5 B) überträgt im ersten Schritt der Kettenverlängerung den Baustein auf die Ketosynthase (KS). Diese katalysiert die Claisen-Kondensationsreaktion zwischen dem aufgeladenen Substrat und dem Verlängerungsbaustein (meistens Malonyl-CoA (**14**) oder Methylmalonyl-CoA (**18**)), gebunden am nächsten ACP (ACP_2 , Abbildung 5 B). Unter Freisetzung von Kohlenstoffdioxid wird die Startereinheit um zwei Kohlenstoffatome verlängert. Dabei trägt nun das ACP_2 die wachsende Kette und überträgt diese wiederum auf die nächste KS für die Verlängerungsreaktion, analog des gezeigten Mechanismus in Abbildung 5 B.

Die durch die Verlängerungsreaktion produzierten β -Ketoester können durch weitere Enzyme modifiziert werden (Abbildung 6). Eine Ketoreduktase (KR) reduziert die β -Ketogruppe selektiv zur (*R*)- oder (*S*)-konfigurierten Hydroxygruppe. Dehydratasen (DH) eliminieren die sekundären Hydroxygruppen zum *cis*- oder *trans*-Olefin. Die Enoylreduktase (ER) überführt Alkene zum gesättigten Alkan. Bei der FAS wird die Reduktionskaskade immer vollständig durchlaufen, sodass gesättigte Fettsäuren produziert werden. Ungesättigte Fettsäuren werden nachträglich durch Desaturasen aus der gesättigten Form generiert.¹² Im Gegensatz dazu ist der

Reduktionsgrad bei den PKS variabel. Die PKS kann die Reduktionskaskade auf jeder Stufe stoppen, sodass alle Intermediate möglich sind (Abbildung 6). Die optionale Verwendung der Reduktionsenzyme KR, DH und ER führt somit zu unterschiedlichen Polyketidstrukturen. Kombiniert mit weiteren optionalen Domänen wie z.B. eine Methyltransferase, die α -ständig zum Thioester das Intermediat methyliert, wird die strukturelle Diversität der Polyketide noch weiter vergrößert.

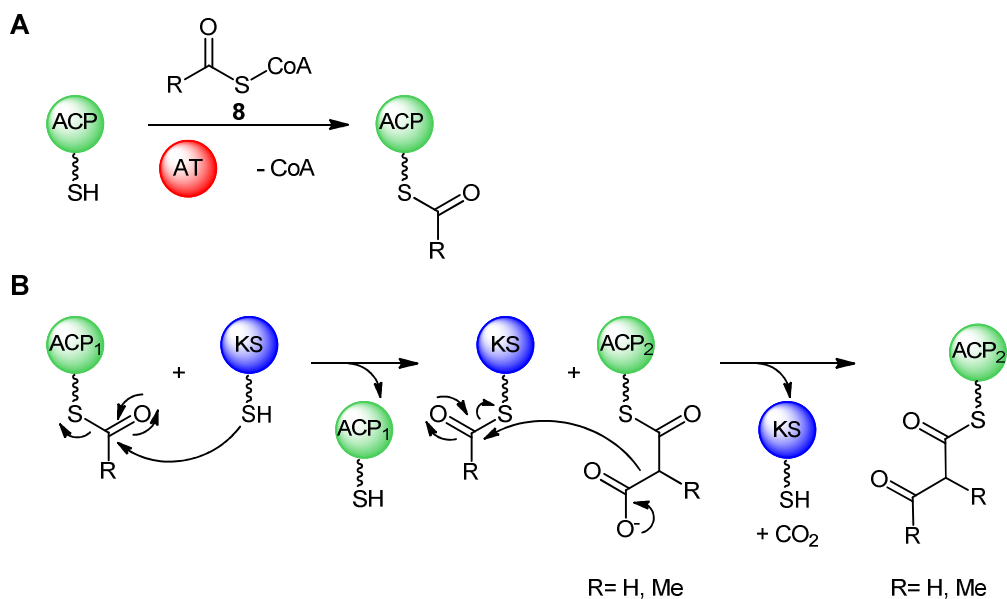


Abbildung 5: A) AT-katalysierte Beladung einer *holo*-ACP mit dem aktivierten Acyl-Baustein **8**, B) Claisen-artige Kettenverlängerungsreaktion: Zuerst überträgt das ACP_1 die Startereinheit (in den folgenden Verlängerungsschritten die wachsende Kette) auf die KS. Diese katalysiert die Kondensation zwischen dem beladenen Substrat und der Elongationseinheit **14** oder **18**, gebunden an der ACP_2 . ACP_1 und ACP_2 stellen zwei aufeinanderfolgende ACPs dar.

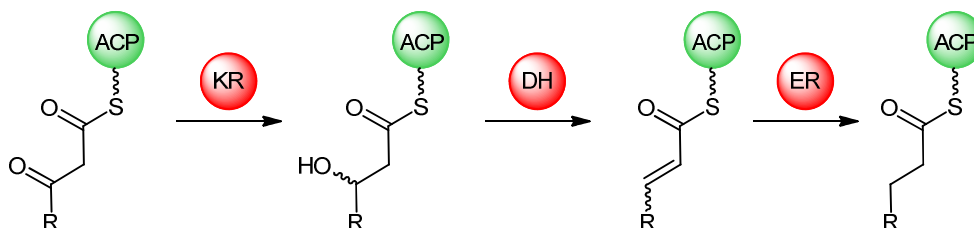


Abbildung 6: Reduktionskaskade in FAS und PKS durch die Enzyme KR, DH und ER.

Das Ende der Polyketidbiosynthese determiniert in den meisten PKS eine Thioesterase (TE), die am C-Terminus der PKS lokalisiert ist.¹⁷ Thioesterasen haben eine konservierte, katalytische Triade, bestehend aus Serin (Ser), Histidin (His) und Asparaginsäure (Asp) (Abbildung 7). Im ersten Schritt wird das Polyketid vom ACP auf die Hydroxygruppe des Serins übertragen. Der durch Asp stabilisierte His-Rest fungiert

als Protonenakzeptor und katalysiert somit den nukleophilen Angriff der Ser-OH am Carbonylkohlenstoff. Die negative Ladung der tetraedischen Zwischenstufe wird wahrscheinlich durch das Peptidrückgrat der TE stabilisiert. Je nach Art der TE wird entweder durch Angriff von Wasser der Sekundärmetabolit als freie Säure, oder durch einen intramolekularen Angriff einer Amino- oder Hydroxygruppe ein Makrozyklus freigesetzt.

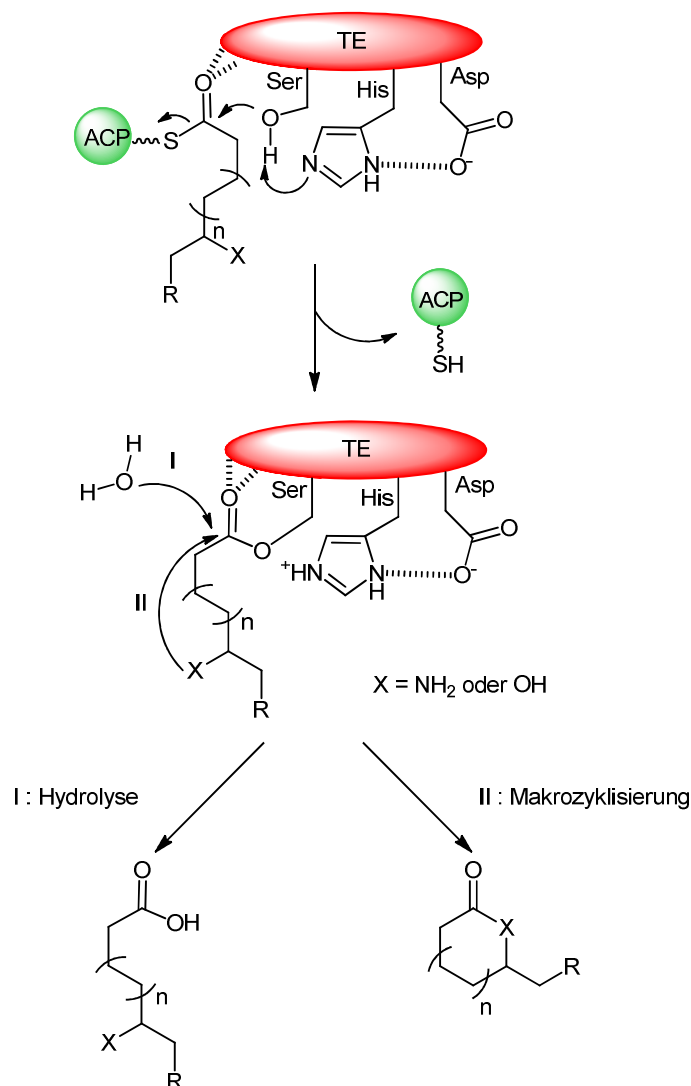


Abbildung 7: Genereller Abspaltungsmechanismus einer TE: Nach der kovalenten Bindung des Substrats an die TE kann das Polyketid als offenkettige Säure (I) oder durch Makrozyklisierung (II) freigesetzt werden.¹⁷

Nach der Abspaltung der Polyketide von der PKS können nachgeschaltete Enzyme, sogenannte „Tailoring-Enzyme“, die chemische Struktur weiter modifizieren. Sowohl Oxidationsreaktionen, Methylierungen von O-, N- oder C-Atomen, aber auch O-, N- oder C-Glykosylierungen sind bisher bekannt¹⁸ Beispiele für post-PKS-Modifikationen sind in

einigen Biosynthesewegen von Sekundärmetaboliten in den nächsten Kapiteln gezeigt (vgl. Abbildung 9, Abbildung 10, Abbildung 23).

1.1.2 Klassifizierung von Polyketidsynthasen

Die Klassifizierung der PKS erfolgt sowohl anhand des modularen Aufbaus, als auch anhand der Funktionsweise (Abbildung 8).^{11,19} Resultierend aus diesen Kriterien werden PKS in Typ I, Typ II und Typ III unterteilt. Dabei sind Typ I PKS sowohl in Bakterien, als auch in Pilzen vorhanden. Hingegen hat man bisweilen Typ II PKS nur in Bakterien identifiziert. Typ III PKS sind hauptsächlich in Pflanzen, aber auch in einigen Bakterien und Pilzen zu finden.

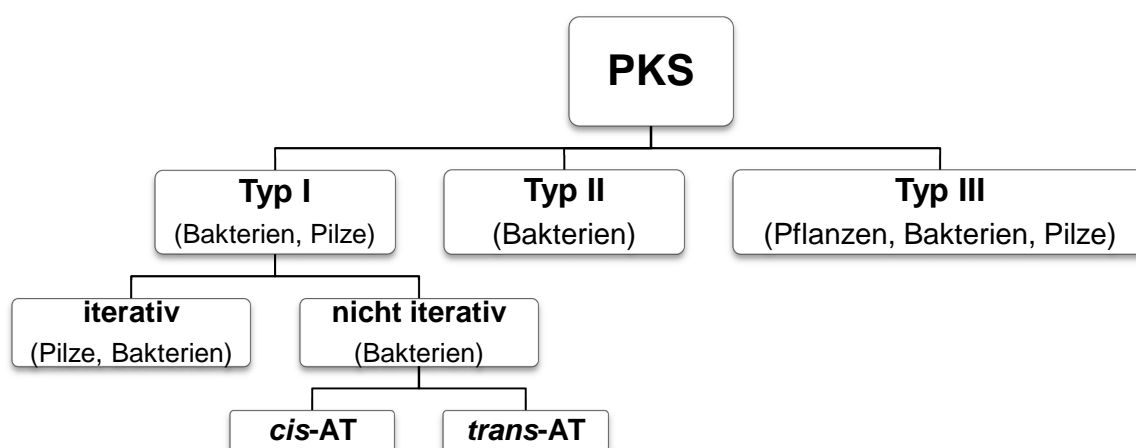


Abbildung 8: Klassifizierung von PKS.

1.1.2.1 Typ I Polyketidsynthasen

Innerhalb der Typ I PKS wird zunächst zwischen iterativen und nicht-iterativen PKS unterschieden (Abbildung 8).^{11,19} Iterative PKS sind überwiegend in Pilzen zu finden, beispielsweise in der Biosynthese von Lovastatin (**20**) durch *Aspergillus terreus* (Abbildung 9).²⁰

Bei der iterativen Variante der PKS wird ein Modul für die Kettenverlängerung repetitiv verwendet.^{11,19} Anhand der Anwesenheit von β -Keto-prozessierenden Modulen wird zwischen nicht-reduzierenden (NR), partial-reduzierenden (PR) und hoch-reduzierenden (HR) differenziert. Trotz der iterativen Kettenverlängerung kann der Reduktionsgrad zwischen den einzelnen Verlängerungsschritten variieren. Optionale Domänen wie KR, DH, ER oder Methyltransferasen (MT) sind dabei nicht in jeder Kettenverlängerung aktiv.

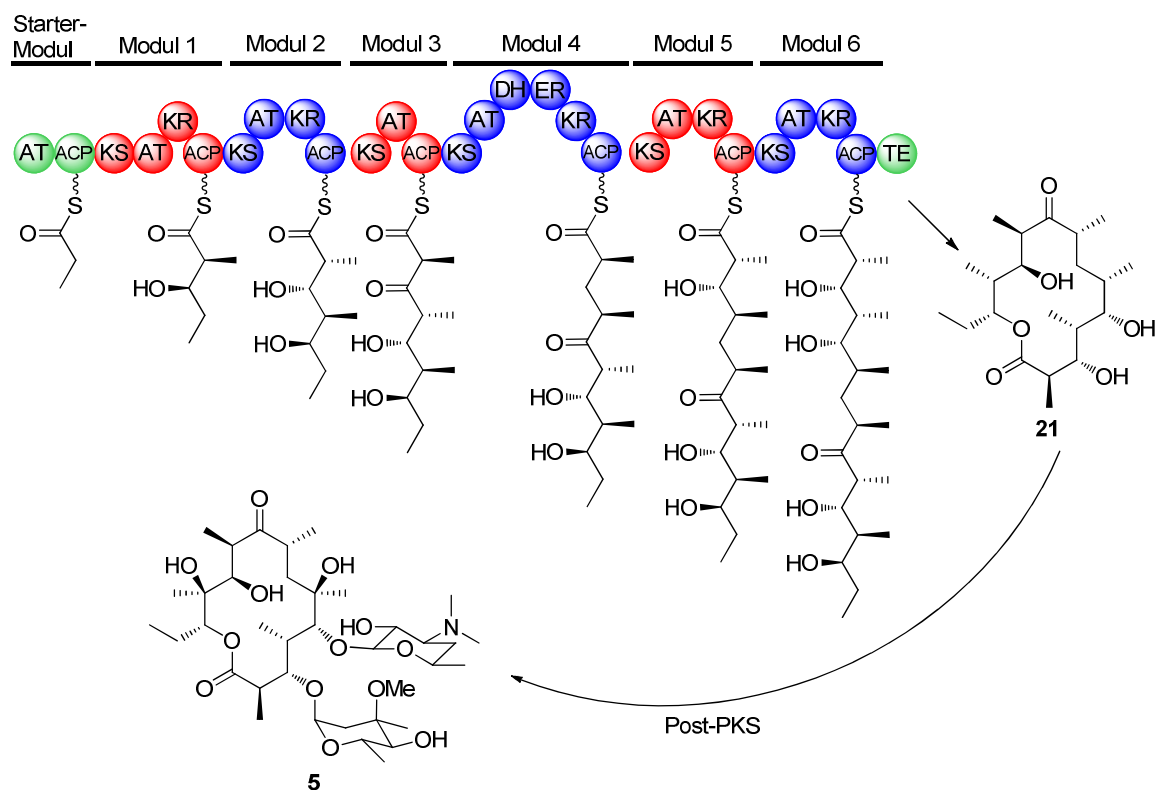


Abbildung 10: Biosynthese des Erythromycin A (5).¹¹

Jedoch wurden auch nicht-iterative Typ I PKS isoliert, die dem Colinearitätsprinzip nicht folgen. Bei der Biosynthese werden Module teilweise mehrfach durchlaufen, sind inaktiv oder die Domänenabfolge stimmt nicht mit der Polyketidstruktur überein. Bei diesen PKS sind die AT-Domänen nicht in die Module integriert.^{24,25} Vielmehr beladen alleinstehende AT die ACPs mit Verlängerungsbausteinen. Zur Differenzierung der beiden nicht-iterativen Typ I PKS-Arten wurden die Terminologien *cis*-AT und *trans*-AT eingeführt.²⁶ *Cis*-AT-PKS repräsentieren dabei PKS, bei denen die AT in den Enzymkomplex integriert sind (Abbildung 11). 6-dEB **21** ist ein Vertreter der *cis*-AT-PKS (Abbildung 10). PKS mit freistehenden AT werden in die Gruppe der *trans*-AT eingeordnet.

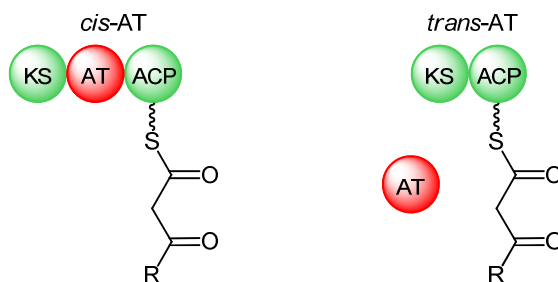


Abbildung 11: *Cis*-AT-PKS mit integrierter AT und *trans*-AT-PKS mit freistehender AT.

Aufgrund von phylogenetischen Untersuchungen wurde gezeigt, dass sich die beiden PKS-Arten unabhängig voneinander aus einfachen FAS entwickelt haben, sodass eine Differenzierung in *cis*- und *trans*-AT-PKS auch aus evolutiver Sicht sinnvoll erscheint.²⁷ Trotz der scheinbaren Ähnlichkeiten von *trans*-AT-PKS zu den *cis*-AT-PKS gibt es viele funktionelle Besonderheiten. Der größte Unterschied zwischen den beiden PKS-Systemen liegt in der Modulvielfalt von *trans*-AT-PKS. Während bislang bei den *cis*-AT-PKS nur acht verschiedene Modultypen gefunden wurden (KS-AT-ACP, KS-AT-KR-ACP, KS-AT-DH-KR-ACP, KS-AT-DH-ER-KR-ACP und deren Analoga mit MT Domänen), kennt man von den *trans*-AT-PKS-Systemen inzwischen mehr als 50 Modulvarianten, viele davon mit neuartigen oder ungewöhnlichen Domänen.¹⁰ Die Kombination dieser architekturellen Vielfalt mit Abweichungen von den Colinearitätsregeln in vielen Modulen führte dazu, dass die bekannten Regeln für *cis*-AT-PKS meist nicht auf *trans*-AT-PKS angewendet werden können. Somit ist die Korrelation eines *trans*-AT-PKS-Moduls mit einer biosynthetischen Funktion oft schwierig. Durch phylogenetische und biosynthetische Studien wurde jedoch ein „Regelwerk“ entwickelt, mit dem eine Vorhersage des Metaboliten anhand der Modulanordnung möglich ist.²⁶ Dieses „Regelwerk“ basiert auf einer Verwandtschaftsanalyse der KS, anhand der die Substrattoleranz der KS vorausgesagt werden kann.

Der erste Gencluster einer *trans*-AT-PKS wurde in *Bacillus subtilis* entdeckt, jedoch konnte dem Gencluster lange Zeit kein Polyketid zugeordnet werden.²⁸ Spätere Studien belegen, dass Bacillaen (**22**) der produzierte Metabolit des *trans*-AT-Genclusters ist (Abbildung 12).^{29,30} Das erste Polyketid, das einer *trans*-AT-PKS zugeordnet werden konnte, war jedoch Pederin (**23**).²⁵

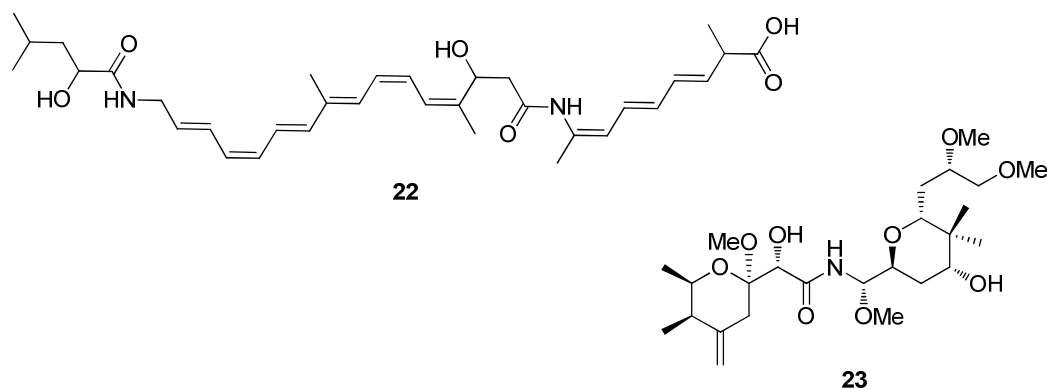
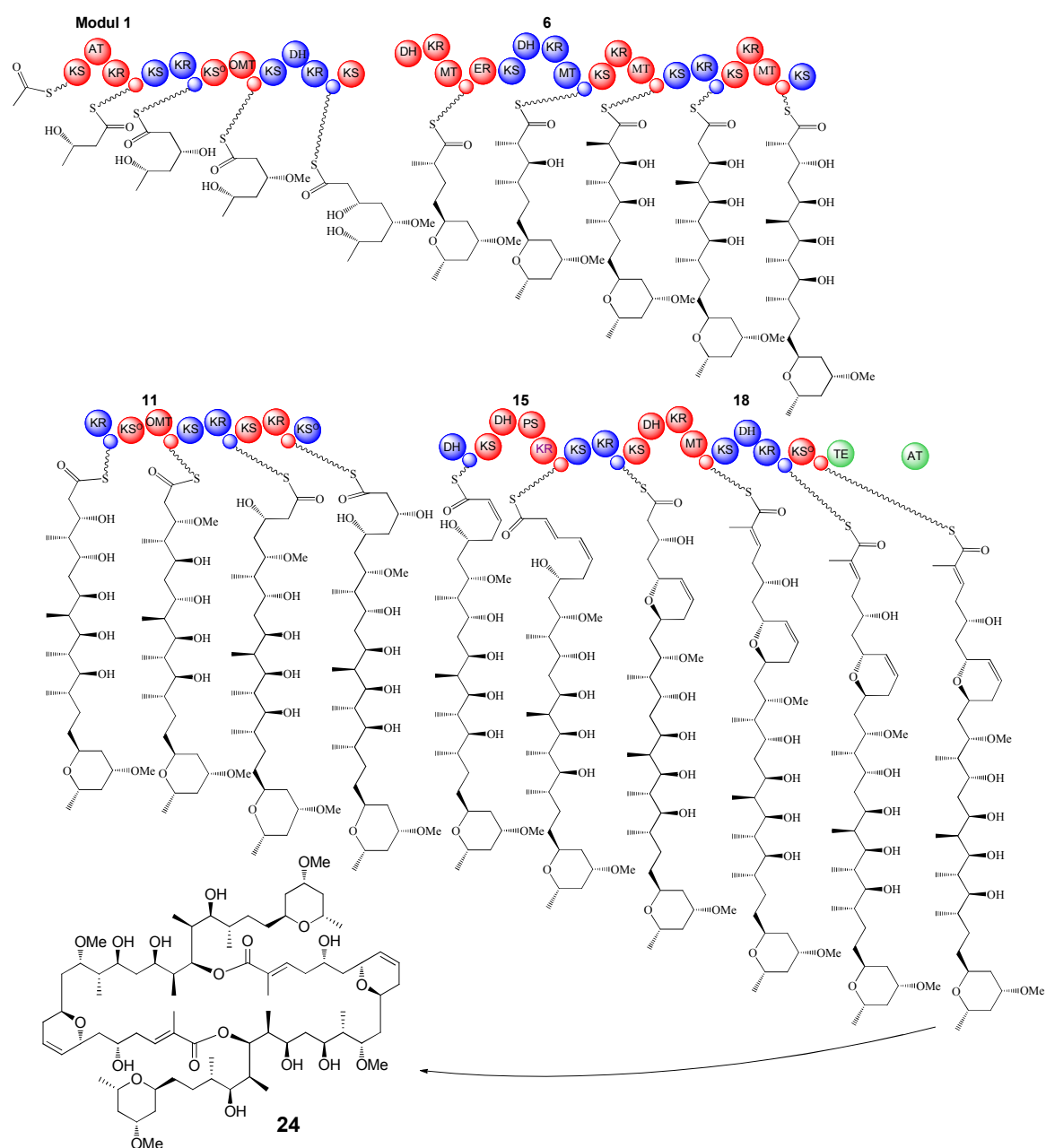


Abbildung 12: Polyketide von *trans*-AT-PKS: Bacillaen (**22**) und Pederin (**23**).

Abbildung 13: Postulierte Biosynthese des Misakinolid A (**24**).³¹



Nach dem Beladen des Startermoduls mit Acetyl-CoA (**11**) wird in 17 Verlängerungsschritten das Monomer gebildet. Interessanterweise scheint das Modul 18 der Biosynthese inaktiv zu sein, sodass zwei Intermediate des Moduls 17 zum Sekundärmetaboliten **24** dimerisieren.³¹ Biologisch wirkt Misakinolid A (**24**) inhibierend auf die Actin-Polymerisation.

1.1.2.2 Typ II Polyketidsynthasen

Iterative Typ II PKS hat man bisher ausschließlich in Prokaryoten entdeckt.¹¹ Bis auf zwei Ausnahmen stammen alle bisher entdeckten Typ II PKS aus Actinomyceten.^{32,33} Charakteristisch für diese Gruppe ist ein minimaler Satz an katalytischen Domänen, die alle von verschiedenen Genen exprimiert werden. Die „minimal-PKS“ ist dabei aus zwei KS-Einheiten, oder auch „Chain-length-factor (CLF)“ genannt, und einem ACP (Abbildung 14). Optionale Domänen, wie KR, Cyclasen oder Aromatasen, variieren das Faltungsmuster der Intermediate. Ein Beispiel für eine Typ II-PKS ist die Biosynthese des Doxorubicins (**25**), das aufgrund seiner zytostatischen Wirkung in der Antitumorthherapie eingesetzt wird.^{11,34}

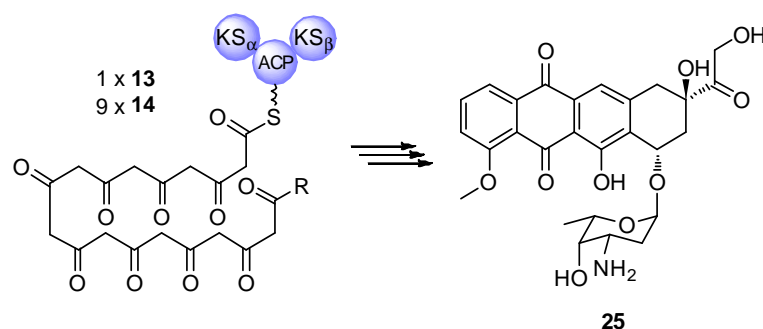


Abbildung 14: Biosynthese des Doxorubicins (**25**).¹¹

1.1.2.3 Typ III Polyketidsynthasen

Lange Zeit wurde postuliert, dass Typ III PKS exklusiv in Pflanzen, in Form von Chalcon/Stilben-Synthasen, vorkommen.¹¹ Mittlerweile wurden aber auch in Bakterien und Pilzen Typ III PKS nachgewiesen.^{35,36} Diese iterativen Systeme wählen die Starteinheit aus, prozessieren die Ketteverlängerung und katalysieren die Faltung des Metaboliten. Ähnlich zu den FAS wird die Größe des produzierten Polyketids durch das Volumen des Hohlraums der PKS determiniert. Typische Produkte der Typ III PKS sind aromatische, mono- oder bityclische Polyketide, wie die Flavonoide oder das Germidicin.^{37,38} Als Beispiel für eine pflanzliche Typ III Polyketidbiosynthese ist die des Naringenchalcon (**26**) gezeigt. (Abbildung 15).

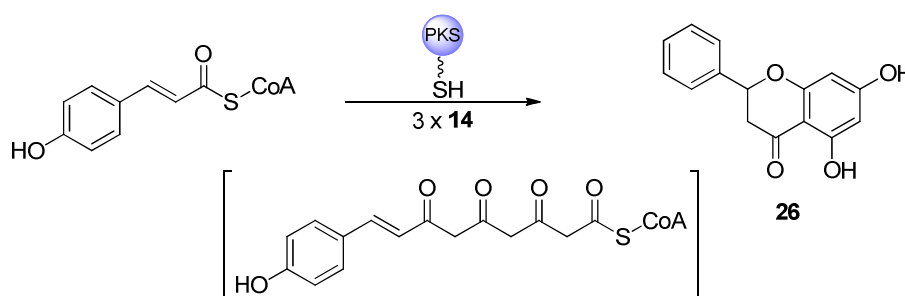


Abbildung 15: Beispiel einer Typ III PKS anhand der Biosynthese von Naringenin (26).¹¹

1.2 Nicht-ribosomale Peptidsynthasen

Nicht-ribosomale Peptidsynthasen (NRPS) bilden, wie auch die Typ I PKS, multimodulare Riesenenzyme, die am Sekundärmetabolismus von Bakterien und Pilzen beteiligt sind.³⁹ NRPS produzieren Metabolite durch die Verknüpfung von Peptiden, jedoch werden neben den 20 proteinogenen *L*-Aminosäuren auch nicht-proteinogenen Aminosäure eingebaut. Bis heute wurden in der Natur etwa 500 Aminosäuren entdeckt, von denen etwa 96% zur Synthese von bioaktiven Peptidgerüsten verwendet wird.⁴⁰ Die restlichen werden als Zwischenprodukte im Primärmetabolismus produziert. Kombiniert mit der Verwendung von Fettsäuren, Heterozyklen und Zuckern bei der Biosynthese, resultiert daraus eine große strukturelle Diversität innerhalb der nicht-ribosomalen Peptide (NRP). Dabei besitzen viele NRP interessante biologische Aktivitäten mit medizinischem Nutzen. Eingesetzt werden NRP beispielsweise als Antibiotika (Vancomycin (**4**), Daptomycin (**27**)), als Zytostatika (Bleomycin A₂ (**28**)) oder als Immunsuppressiva (Cyclosporin (**29**)) (Abbildung 16).

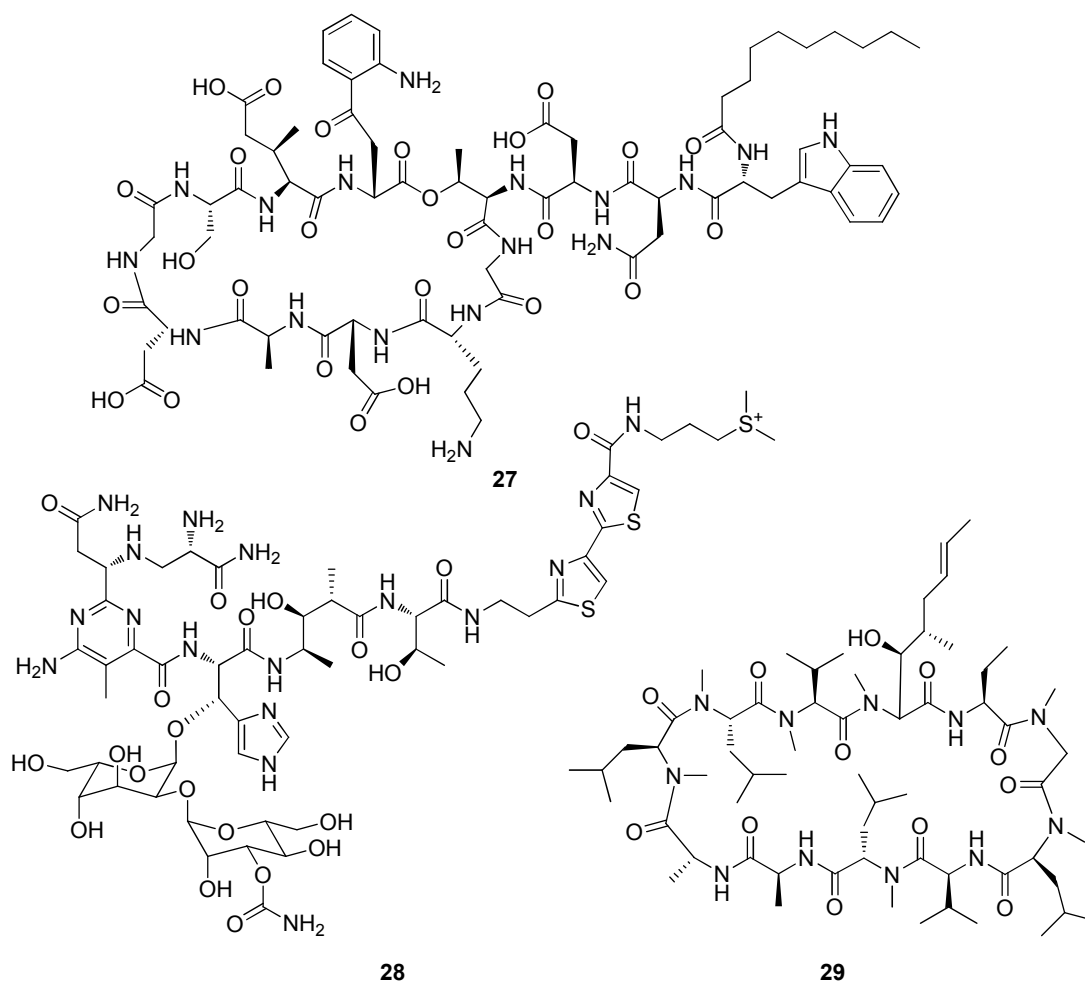


Abbildung 16: NRPS-Peptide: Daptomycin (27), Bleomycin A₂ (28), Cyclosporin A (29).

1.2.1 Biosynthese von nicht-ribosomalen Peptiden

Trotz der strukturellen Vielfalt der durch NRPS gebildeten Peptide liegt ihrer Biosynthese, wie bei den PKS, ein hoch konservierter Thiotemplatmechanismus zugrunde.³⁹ Hierbei generiert das modular aufgebaute Riesenzym die Metaboliten durch die Verknüpfung von Aminosäuren.^{15,41–44} Diese Peptidbausteine sind kovalent über Thioesterbrücken an ein Modul des Enzyms gebunden, das diesen Baustein in die wachsende Kette inkorporiert. Innerhalb der Module gibt es Domänen, die die einzelnen Teilschritte der Kettenverlängerung katalysieren. Ein minimales NRPS-Modul besteht aus drei Domänen: Adenylierungsdmäne (A), Kondensationsdmäne (engl.: Condensation Domain, kurz: C) und Peptidylträgerprotein (engl.: Peptidyl-carrier protein, kurz: PCP).

Jede nicht-ribosomale Peptidbiosynthese wird durch die selektive Auswahl und Aktivierung von Peptidbausteinen durch die A-Domänen initiiert und prozessiert. Nach der Auswahl des entsprechenden Bausteins aktiviert die A-Domäne das einzubauende

Peptid **30** unter Verbrauch von ATP (**9**) (Abbildung 17). Das Aminoacyl-Adenylat **31** wird anschließend durch die A-Domäne auf das PCP übertragen.

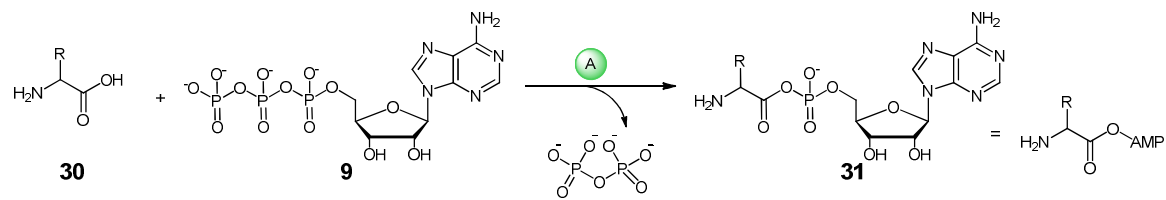


Abbildung 17: A-Domänen katalysierte Aktivierung des Peptidbausteins **30** mit ATP (**9**) zum AMP-Derivat **31**.

Analog zum ACP in der PKS-Biosynthese muss auch das PCP aktiviert werden, damit es den Baustein **31** von der A-Domäne kovalent binden kann. Die Aktivierung des *apo*-PCP zur *holo*-PCP erfolgt durch eine Phosphopantetheinylierung eines konservierten Serinrestes des PCP (Abbildung 18 A). Der Mechanismus ist identisch zur ACP-Aktivierung (Abbildung 4). Die terminale Thiolgruppe kann, durch nukleophilen Angriff am Carbonylkohlenstoff des aktivierten Bausteins **31**, das Substrat kovalent an das PCP binden (Abbildung 18 B). Nach der Aktivierung und Übertragung der Aminosäure auf das PCP wird die Kette durch die Kondensation mit dem Peptidbaustein, gebunden an dem nachfolgenden PCP, verlängert. Diese Verknüpfungsreaktion wird durch die C-Domäne katalysiert (Abbildung 18 C). Das Ende der NRP-Biosynthese determiniert im Allgemeinen eine Thioesterase (TE), die analog zur PKS-TE entweder lineare Peptide oder Makrozyklen freisetzt (Abbildung 7).

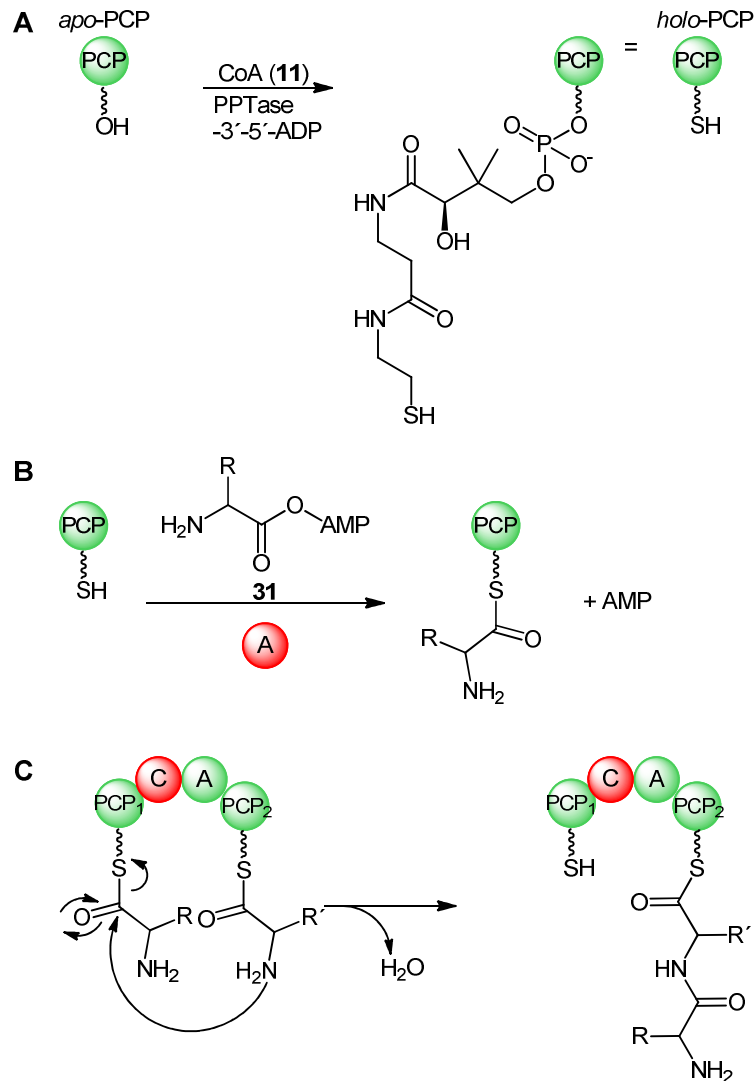


Abbildung 18: A) Aktivierung der PCP durch Übertragung einer 4'-Phosphopantetheinylgruppe; B) A-Domänen katalysierte Übertragung des Bausteins **31** auf das *holo*-PCP; C) C-Domänen katalysierte Kondensation zwischen zwei Bausteinen, gebunden an aufeinanderfolgenden PCPs (PCP₁ und PCP₂).

Neben den drei für die Biosynthese essentiellen Domänen (A, C und PCP) gibt es eine Reihe an optionalen Domänen („Tailoring-Domänen“), die das Peptidintermediat modifizieren. Eine Methyltransferase (MT) katalysiert die Übertragung eines Methylrestes auf das Peptid, meist auf eine Aminofunktion. Epimerasen wandeln L-konfigurierte Aminosäuren in die D-Form um. Cyclasen initiieren einen intramolekularen Angriff von freien Hydroxy- oder Aminogruppen aus Cystein, Serin oder Threonin an benachbarte Carbonylkohlenstoffe. Durch anschließende Dehydratisierung werden Heterozyklen gebildet. Oxidasen katalysieren die Oxidation der Heterozyklen zu den entsprechenden Heteroaromaten. Halogenasen modifizieren das Peptid durch den Einbau von Halogenen. Dabei werden sowohl aktivierte Kohlenstoffatome in heteroaromatischen Resten, als auch nicht-aktivierte, aliphatische Kohlenstoffatome halogeniert. Formylasen katalysieren die Formylierung terminaler Aminogruppen.

1.2.2 Hormaomycin – Struktur, Eigenschaften und Biosynthese

Aus dem Bakterium *Streptomyces* sp. AC-1978 wurde 1984 ein bis dahin neuartiges Peptid isoliert, das interessante biologische Eigenschaften aufwies.⁴⁵ Bis auf die Fragmente Isoleucin und Threonin blieb die Struktur, des als Takaokamycin benannten Naturstoffes jedoch ungeklärt. In den folgenden Jahren wurde aus dem Stamm *Streptomyces griseoflavus* W-384 Hormaomycin (**32**) isoliert.⁴⁶ Es zeigte sich, dass Takaokamycin und Hormaomycin (**32**) identisch sind. Die Strukturaufklärung gelang 1990, hingegen wurde die absolute Konfiguration erst 2004 entschlüsselt (Abbildung 19).^{47,48}

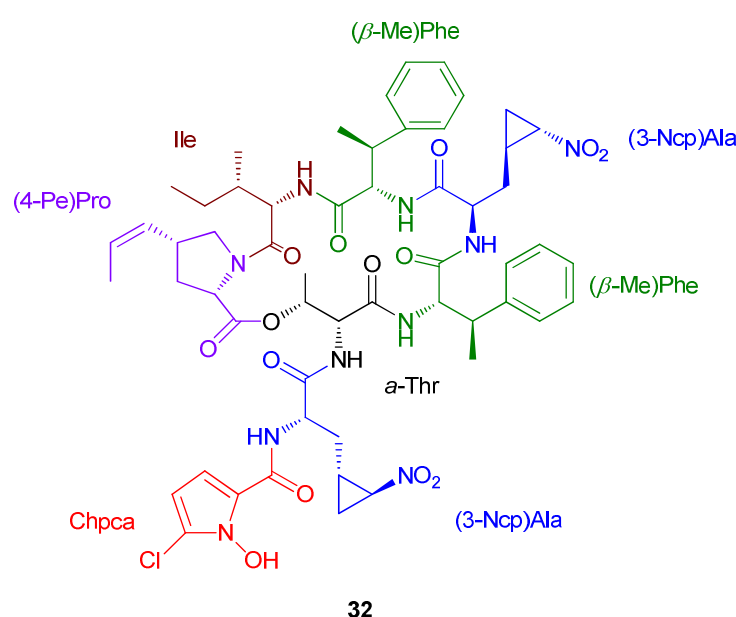


Abbildung 19: Hormaomycin (**32**).

Das Grundgerüst des Hormaomycins (**32**) besteht aus einem 6-gliedrigen Lacton, in dem die Esterbindung zwischen der Hydroxygruppe des (*R*)-*allo*-Threonins (*α*-Thr) und der Säuregruppe des (2*S*, 4*R*)-4-(*Z*-Propenyl)prolins [(4-Pe)Pro] gebildet wird. Der Rest des Ringes wird aufgespannt aus *L*-Isoleucin (Ile), zwei (2*S*,3*R*)-3-Methylphenylalanin [(*β*-Me)Phe]-Fragmenten und (1'*R*,2'*S*)-(trans-2'-Nitrocyclopropyl)alanin [(3-Ncp)Ala]. Über die Aminogruppe des (*R*)-*allo*-Threonins ist das Grundgerüst mit einer Seitenkette, bestehend aus (1'*R*,2'*S*)-(trans-2'-Nitrocyclopropyl)alanin [(3-Ncp)Ala] und 5-Chlor-1-hydroxypyrrol-2-carbonsäure (Chpca) modifiziert. Somit ist in Peptid 32 nur eine proteinogene Aminosäure eingebaut.

Hormaomycin (**32**) zeigt antibiotische Aktivität gegenüber coryneformen Actinomyceten im pikomolaren Bereich, sowie gegenüber dem Malariaerreger *Plasmodium falciparum*

im nanomolaren Bereich.^{46,49} Namensgebend (griechisch: hormao = ich rege an) für das Peptid **32** ist die stimulierende Wirkung sowohl auf die Bildung von Luftmycel, als auch die Produktion von Sekundärmetaboliten in anderen Streptomyceten.

Fütterungsexperimente zeigen, dass die Hormaomycin-NRPS eine breite Substratspezifität aufweist.^{50,51} So wurden anstelle des (3-Ncp)Ala (**33**) auch Nitronorvalin **34**, Nitronorleucin **35** oder Methoxycyclopropylalanin **36** inkorporiert (Abbildung 20). Ebenso wurde (β -Me)Phe (**37**) erfolgreich gegen die mit Fluor substituierten Phenylalaninderivate **38-40**, sowie das nicht substituierte Phenylalanin (**41**) ausgetauscht. Für das Analogon, in dem die Seitenkette durch den Austausch von Fragment **33** gegen Substrat **34** modifiziert wurde, wurde eine antibiotische Aktivität gegen Pilz *Candida albicans* nachgewiesen, wogegen für Hormaomycin (**32**) keine fungizide Wirkung gefunden wurde.⁵²

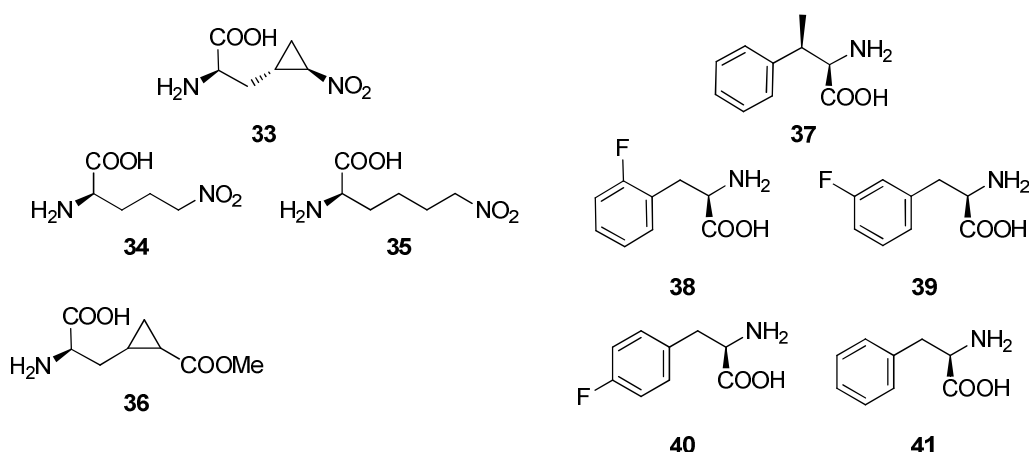


Abbildung 20: Vorläufer-dirigierte Biosynthese: Austausch des natürlichen Fragments **33** gegen die Substrate **34-36**, sowie des Fragments **37** gegen die Substrate **38-41**.

Der 48 Kilobasenpaare (kb) große Gencluster, das die Biosynthese von Hormaomycin (**32**) kodiert, umfasst 23 offene Leserahmen (engl.: Open-reading-frames, kurz: ORFs) (Abbildung 21 A).^{51,53} Die ORFs *hrmO* und *hrmP* kodieren die Hormaomycin-NRPS, die in sieben Module unterteilt ist. *hrmK*, *hrmL*, *hrmM* und *hrmQ* kodieren Biosynthesegene der Startereinheit 5-Chlor-1-Hydroxy-1*H*-pyrrol-2-carbonsäure. Die verbleibenden ORFs kodieren Biosyntheseenzyme von weiteren Bausteinen, Transporter und Regulatoren. Anhand der Studien wurde eine putative Biosynthese des Hormaomycins (**32**) postuliert (Abbildung 21 B).⁵¹

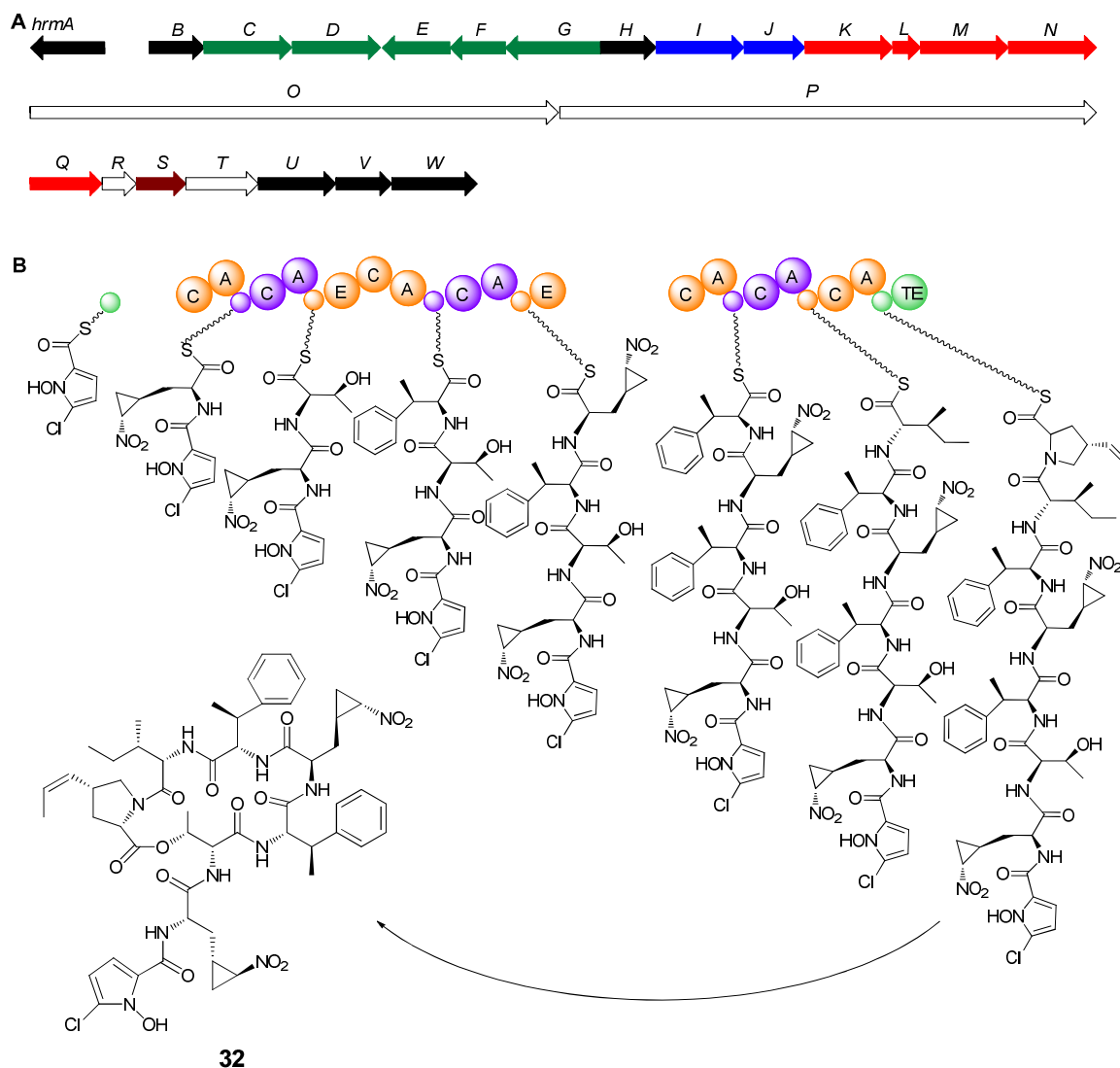


Abbildung 21: A) *Hrm*-Gencluster (*HrmA-W*); die Farben kennzeichnen die putativen Aufgaben des ORF: Schwarz= Regulator- und Transportgene; Rot= putative Chcpa-Biosynthese, Grün= putative (4-Pe)Pro-Biosynthese, Weiß= Hormaomycin-Biosynthese, Blau= putative (3-Ncp)Ala-Biosynthese. **B)** putative Biosynthese des Hormaomycins (**32**); Kreise ohne Beschriftung repräsentieren PCP.

1.3 NRPS-PKS Hybride

Trotz der Unterschiede in Hinsicht auf die verwendeten Bausteine, des zugrunde liegenden Verknüpfungsmechanismus in der Biosynthese und der Struktur des produzierten Metaboliten gibt es Analogien zwischen Typ I-PKS und NRPS.^{15,54} Beide Biosynthesetypen ähneln sich in ihrer Funktion und Organisation, da hier einzelne Bausteine in einer modularen Maschinerie verknüpft werden. So ist es wenig überraschend, dass es NRPS-PKS-Hybride gibt. Einige isolierte Naturstoffe, die durch solche Enzymkomplexe gebildet werden, finden in der Medizin beispielsweise als Zytostatikum (Bleomycin (**42**)) oder als Immunsuppressivum (FK 506 (**43**)) Anwendung (Abbildung 22).^{55,56}

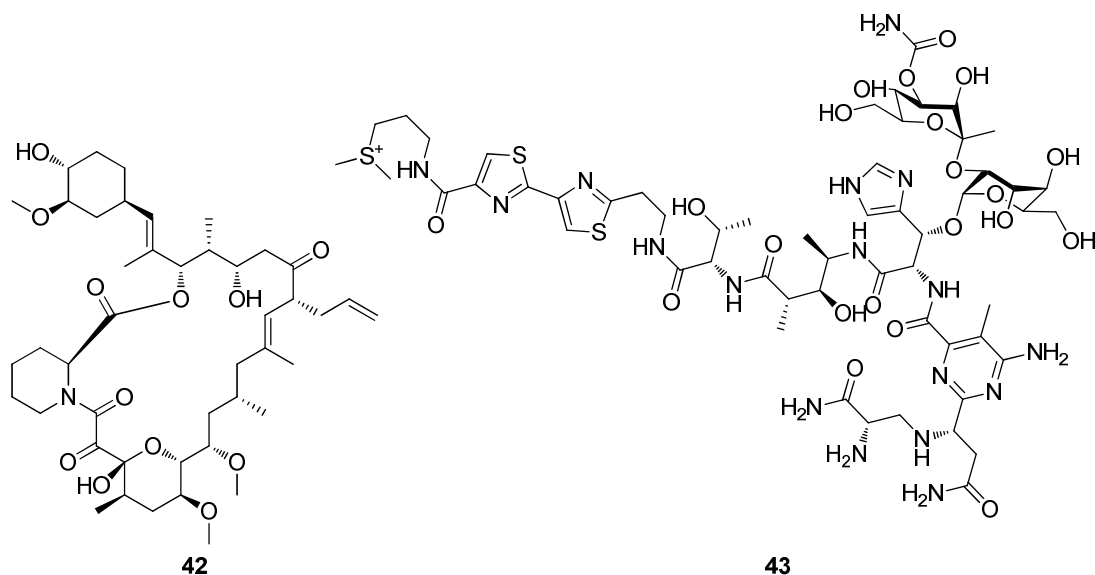


Abbildung 22: Metabolite von NRPS/PKS-Hybriden: Bleomycin (42) und FK 506 (43).

1.3.1 Bacillaen – Struktur, Eigenschaften und Biosynthese

Der antibiotisch aktive Sekundärmetabolit Bacillaen (22) wurde erstmalig aus Extrakten des Stammes *Bacillus subtilis* isoliert.⁵⁷ Die antibiotische Wirkung beruht auf einer Inhibierung der prokaryotischen Proteinbiosynthese, jedoch ist der genaue Mechanismus bislang ungeklärt. Aufgrund der Instabilität des Naturstoffes 22 wurde er erst kürzlich strukturell charakterisiert.^{30,58} Der Bacillaen-Cluster ist schon lange aus dem sequenzierten Genom von *Bacillus subtilis* 168 bekannt und wurde als *pksX*-Cluster bezeichnet.^{28,59,60} Da die Genomsequenz jedoch zahlreiche Fehler enthielt und der Stamm aufgrund einer Mutation keine Polyketide produzieren kann, war die Funktion der kodierten jedoch lange unbekannt. Kryoelektronenmikroskopische Studien von mit Immunogold markierten Stämmen zeigten, dass sich die PksX-Proteine in einer organellenartigen Struktur mit einem Durchmesser größer als 0.1 μm anordnen.⁶¹ Aufgrund der freistehenden AT-Domänen wurde das *pksX*-System der Gruppe der *trans*-AT-PKS zugeordnet. Kürzlich wurde ein weitgehend identischer Gencluster in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42 gefunden, das ebenfalls Proteine für die Produktion von Bacillaen (22) kodiert.²⁹ Biosynthetische Studien führten zur fast vollständigen Aufklärung Bacillaen-Biosynthese (Abbildung 23).^{62–64}

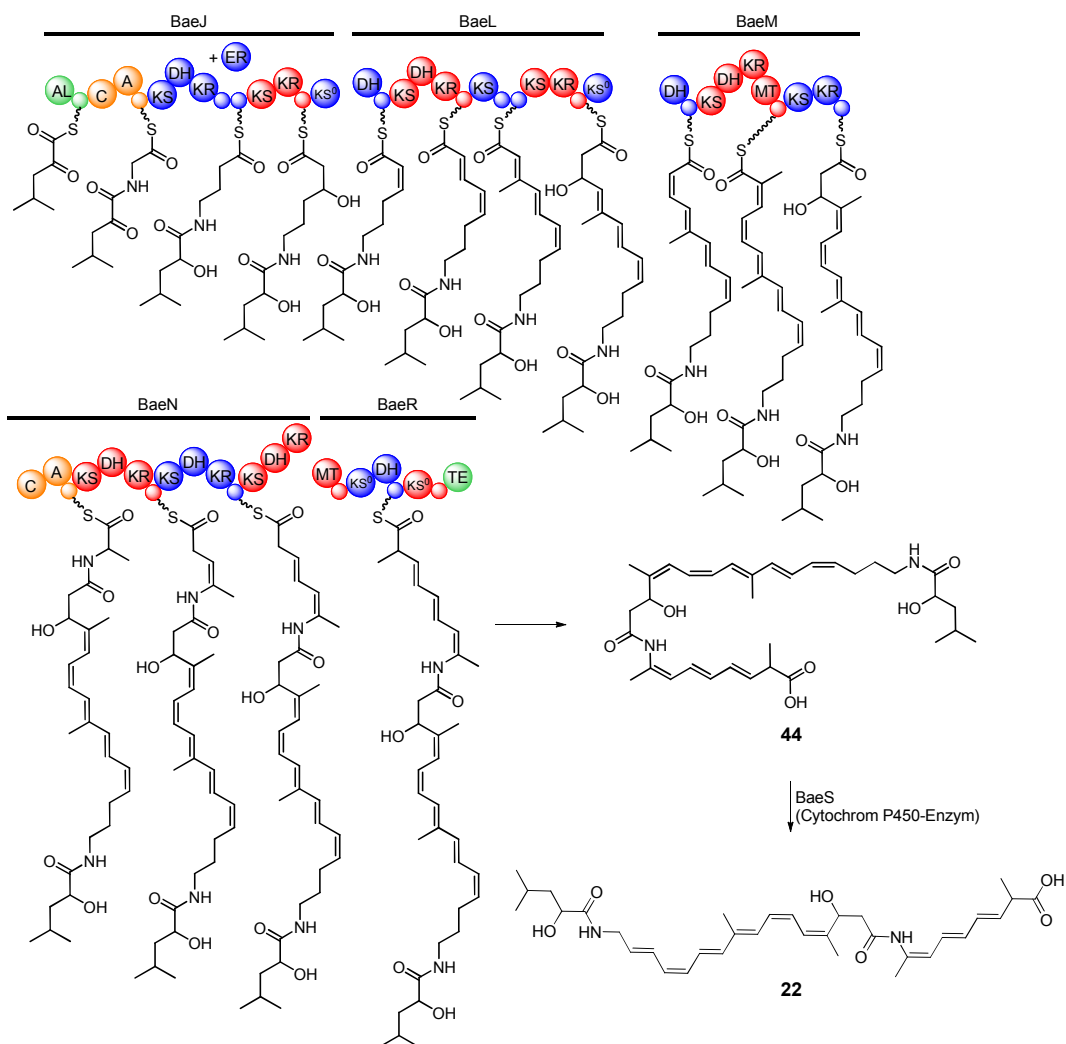


Abbildung 23: Biosynthese von Dehydrobacillaen (**44**) und Bacillaen (**22**); kleine Kreise ohne Beschriftung repräsentieren ACP (grün, rot, blau) bzw. PCP (orange); AL: Acyl-[ACP]-Ligase.

Hierfür wurde eine *B. amyloliquefaciens*-Mutante erzeugt, bei der die TE inaktiviert wurde. Mit Hilfe von LC-HRMS- und LC-NMR-Analysen der Rohextrakte von Fermentationen dieser Mutante konnten 13 verschiedene Metabolite nachgewiesen und als hydrolysierte Intermediate der Bacillaen-Biosynthese identifiziert werden. Dadurch war es möglich, die Funktion aller Module aufzuklären (Abbildung 23). Die Gene *baeJ*, *baeL*, *baeM*, *baeN* und *baeR* kodieren die Biosynthese von Dehydrobacillaen (**44**), das anschließend durch ein Cytochrom-P450-Enzym zum Bacillaen (**22**) oxidiert wird. In die *trans*-AT-PKS (Abbildung 23: rote, blaue und grüne Module) sind zwei NRPS-Module integriert (Abbildung 23: orange Module in BaeJ und BaeN).

Die Studien der Bacillaen-Biosynthese lieferten zahlreiche Erkenntnisse zu ungewöhnlichen Funktionen von *trans*-AT-PKS. Beispielsweise werden Doppelbindungen im Bacillaen über mindestens vier unterschiedliche Mechanismen eingeführt. Weiterhin wurde der Zeitpunkt der Reaktionssequenz charakterisiert, bei der

eine Keto-Funktion in eine Kohlenstoffseitenkette umgewandelt wird.^{65–67} Diese sogenannte β -Verzweigung ist charakteristisch für *trans*-AT-PKS und erfolgt über einen mehrstufigen Mechanismus (Abbildung 24). Im ersten Schritt wird Malonyl-CoA (**14**) durch eine AT auf ein ACP übertragen und dann, katalysiert durch eine freistehende KS, unter CO_2 -Abspaltung in Acyl-ACP umgewandelt. Anschließend initiiert ein Enzym mit Ähnlichkeit zu 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA-Synthasen (HMGS) eine Aldol-Addition des Acetat-Bausteins an die wachsende Kette zum β -Hydroxyintermediat **45**. Im letzten Schritt wird durch Dehydratisierung, gefolgt von Decarboxylierung durch zwei Enoyl-CoA-Dehydratasen (ECH), auch Crotonasen (CR) genannt, der β -Branch installiert.

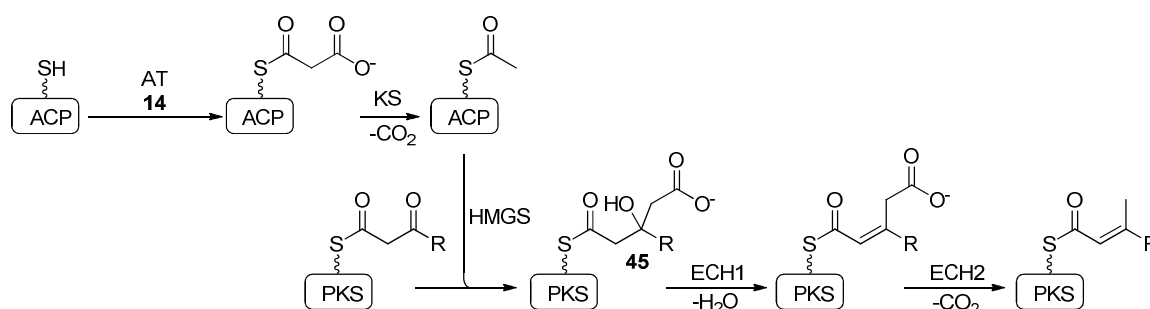


Abbildung 24: Mechanismus der β -Verzweigung in der Bacillaen-Biosynthese.

Vor Kurzem wurden durch LC-NMR-Untersuchungen erstmals saubere NMR-Spektren des Bacillaens (**22**) und verwandter Substanzen gemessen.⁶³ Dabei wurde in *B. amyloliquefaciens* ein neuer Vertreter, das Bacillaen B (**46**), identifiziert, der sich als das tatsächliche Endprodukt der Biosynthese herausstellte (Abbildung 25). Die Substanz unterscheidet sich von Bacillaen (**22**) durch die Existenz einer zusätzlichen Glucoseeinheit.

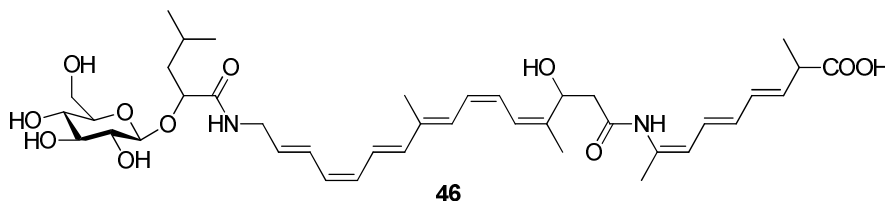


Abbildung 25: Biosynthetisches Endprodukt der Bacillaen-NRPS/PKS: Bacillaen B (**46**).

1.3.2 Psymberin – Struktur, Eigenschaften und Biosynthese

Das hochpotente, antikanzerogen-wirkende Psymberin (**47**), auch Irciniastatin A genannt, wurde zeitgleich aus den Schwämmen *Psammocinia* aff. *bulbosa* und *Ircinia ramosa* isoliert (Abbildung 26).^{68,69} Pharmakologische Studien zeigten, dass der

Naturstoff **47** hochselektiv zytostatisch gegen solide Tumore wirkt. Auf Psymberin-Analoga basierte Analysen belegten weiterhin, dass die Dihydro-Isocoumarin-Einheit essentiell für die antitumorale Aktivität ist.⁷⁰ Aufgrund der geringen Bioverfügbarkeit wurden etwa 600 in elf Jahren akquirierte Fraktionen vereinigt, um die Struktur des Sekundärmetaboliten **47** zu charakterisieren.⁶⁸ Dabei wurde die absolute Konfiguration ein Jahr nach Isolierung durch eine Totalsynthese analysiert.⁷¹ Studien der Gruppe Piel ergaben, dass ein bakterieller Symbiont im Schwamm Produzent von Psymberin (**47**) ist.⁷² Mit dem jetzigen Stand der Technik ist das Bakterium nicht kultivierbar, sodass letztendlich ein metagenomischer Ansatz zur Isolierung des Psymberins-Genclusters führte. Anhand der Studie wurde eine putative Biosynthese für den Naturstoff **47** postuliert (Abbildung 26). Die Biosynthese ist in den Genen *psyA* und *psyD* kodiert. Dabei enthält PsyA drei Module und PsyD zehn Module. Damit ist PsyD das Protein mit den meisten integrierten Modulen, das bis jetzt isoliert wurde. In der isolierten *trans*-AT-PKS ist mit Modul 4 eine NRPS-Einheit integriert, sodass es um ein NRPS-PKS-Hybrid handelt. Initiiert wird die Biosynthese durch eine, mit GCN5 verwandte, *N*-Acyltransferase (GNAT), die die Acyl-Starteinheit **13** auflädt. Modul 1 repräsentiert mit der Domänenabfolge von KS und zwei CR eine β -Verzweigungs-Kassette.

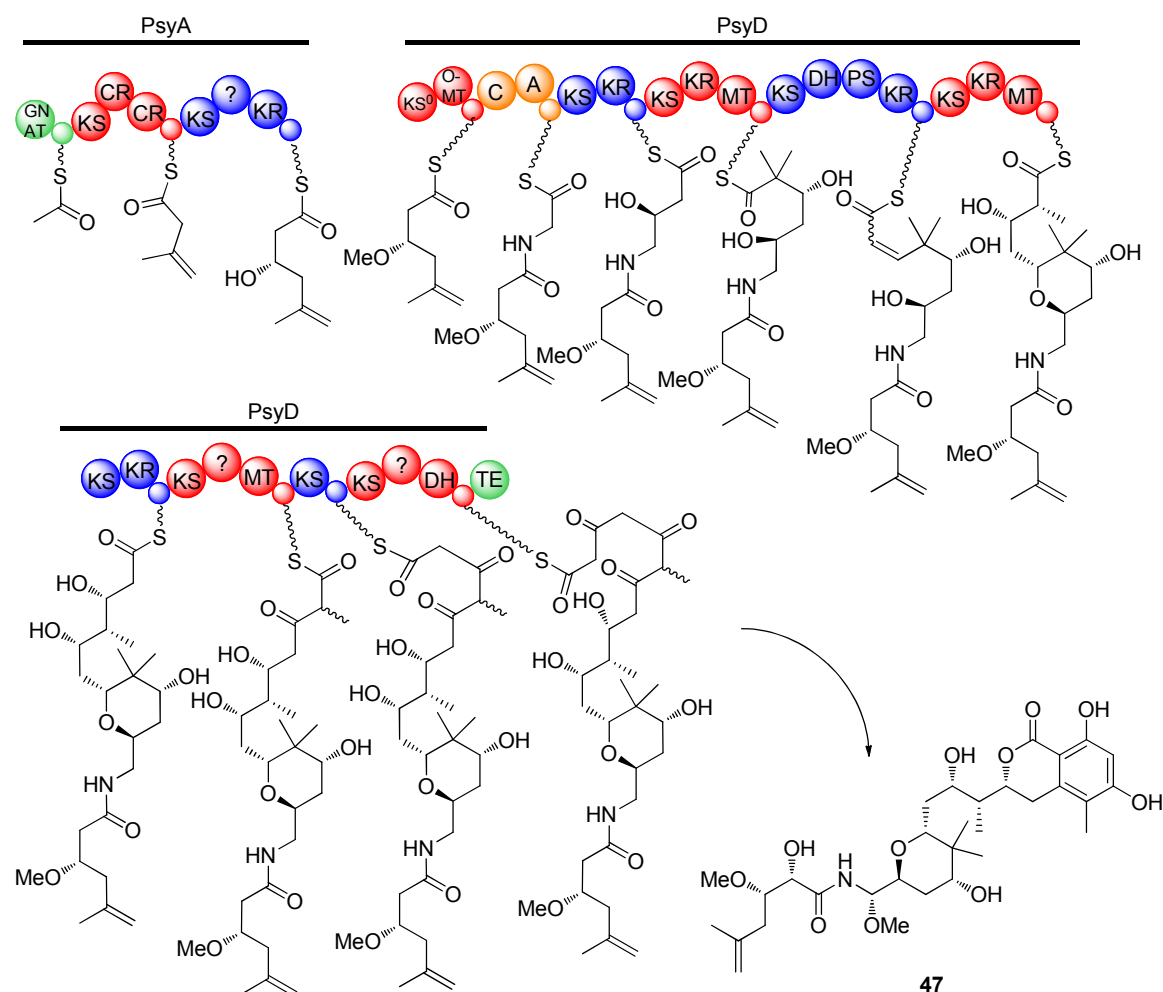


Abbildung 26: Postulierter Biosyntheseweg des Psymberins (**47**); kleine Kreise ohne Beschriftung repräsentieren ACP (grün, rot, blau) bzw. PCP (orange).

1.4 *In-vivo*- und *In-vitro*-Techniken zur Analyse von Biosynthesewegen

Das große Potential von Sekundärmetaboliten für medizinische Anwendungen fördert das Interesse an der Erforschung ihrer Biosynthesen, die jedoch aufgrund mehrerer Faktoren erschwert ist. Am Beispiel der Isolierung und Charakterisierung des Psymberins (**47**) wird es offensichtlich, dass die Gewinnung von Naturstoffen oft nur mit geringen Ausbeuten möglich ist (vgl. Kapitel 1.3.2). Für klinische Studien werden allerdings große Mengen potentieller Pharmazeutika benötigt. Totalsynthesen sind als eine attraktive Alternative zur Biosynthese oft zu aufwendig und kostspielig. Verschärft wird die Problematik durch die Tatsache, dass viele Naturstoffproduzenten sich mit den verfügbaren Techniken nicht kultivieren lassen, sodass auch die großtechnische Fermentation nur bedingt Verwendung findet. Die Forderung nach neuen Krebstherapeutika oder Antibiotika drängt jedoch die Wissenschaft zur Entwicklung neuer Techniken.

1.4.1 *In-vivo*-Techniken

In-vivo-Techniken erlauben Untersuchungen im lebenden Organismus. Am Beispiel der Erforschung der Bacillaen-Biosynthese wurde das Potential von *In-vivo*-Methoden gezeigt.⁶² Durch Erzeugung einer TE-deletierten Mutante wurde, durch die Charakterisierung aller Intermediate, die komplette Polyketidbiosynthese entschlüsselt. Ebenso ist es möglich, durch die Fütterung von Isotopen-markierten Bausteinen, wie z.B. ¹³C-markierten Acetat, Erkenntnisse über Biosynthesewege zu erlangen.⁷³ Auch die Fütterung von synthetisierten Intermediaten oder Derivaten kann zur Aufklärung beitragen. Es wurde bereits mehrfach erfolgreich gezeigt, dass sowohl Intermediate, als auch Derivate biologischer Zwischenstufen als *N*-Acetylcysteamin-Thioester **48** (SNAC-Thioester) von Bakterien akzeptiert und weiter prozessiert werden.^{74–77} SNAC-Thioester imitieren dabei das normalerweise CoA-gebundene Substrat. Die Verwendung von SNAC-Thioestern **48** hat im Vergleich zum CoA (**11**) mehrere Vorteile: Zum einen ist das kommerziell erhältliche *N*-Acetylcysteamine wesentlich günstiger als CoA (**11**). Zum anderen sind SNAC-Thioester **48** stabiler und einfacher handzuhaben, da z.B. keine labilen Phosphoester integriert sind. Nicht zuletzt ist die Atomökonomie bei der Verwendung SNAC-Thioestern **48** effizienter, da der Thioester **48** bei der Beladung abgespalten wird.

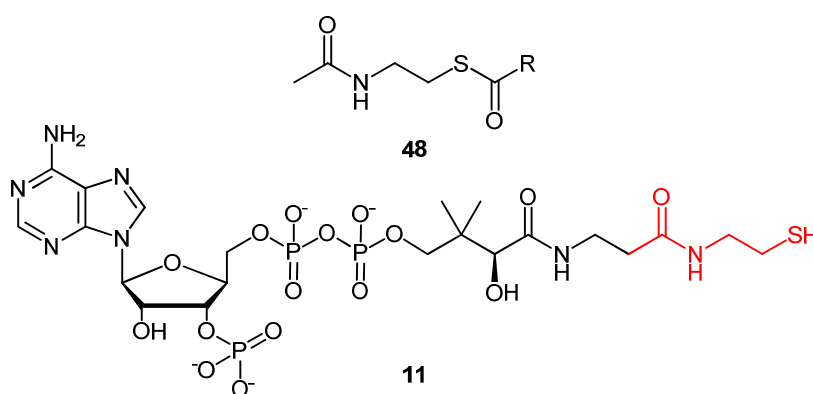


Abbildung 27: SNAC-Thioester **48** und CoA (**11**).

1.4.2 *In-vitro*-Techniken

Die in Kapitel 1.4.1 beschriebenen Methoden sind jedoch nur anwendbar, wenn der Produzent unter Laborbedingungen kultiviert werden kann. Bei Bakterien für die es bisher keine geeigneten Bedingungen zur Kultivierung gibt, wurden *In-vitro*-Methoden entwickelt, um Biosynthesewege zu erforschen. Neben der heterologen Produktion einzelner Proteine und Domänen, können ganze Gencluster in kultivierbare Wirte, wie z.B. *E. coli*, transferiert werden.⁷⁸ Durch die Übertragung ganzer PKS-Gencluster in

kultivierbare Wirte sind *In-vivo*-Studien möglich, bei denen die Bioverfügbarkeit von Metaboliten verbessern werden kann.⁷⁹

1.5 ARCUT-System

Für die Studien von Biosynthesewegen ist es oft notwendig, die DNA des Produzenten zu fragmentieren, um beispielsweise Knockout-Mutanten zu erzeugen. Neben der unspezifischen, mechanischen Fragmentierung von DNA durch das Ausüben von Scherkräften auf die DNA ist Verwendung von Restriktionsenzymen üblich. Natürlich vorkommende Restriktionsenzyme agieren sequenzspezifisch im Bereich von vier bis acht Basenpaaren (bp). Bei einer hypothetischen, statistischen Verteilung der vier Nukleinbasen Adenin (**49**, A), Cytosin (**50**, C), Guanin (**51**, G) und Thymin (**52**, T) würde ein 6-bp spezifisches Restriktionsenzym die DNA alle $4^6 = 4096$ bp schneiden (Abbildung 28 A). Deshalb eignen sich Restriktionsenzyme nur zufriedenstellend für kleine Plasmide mit einer Größe von 4 – 5 kb.⁸⁰ Bei größeren Plasmiden, Fosmiden oder Cosmiden ist die Anwendung limitiert, da zum einen die niedrige Spezifität der Enzyme oft zur mehrfachen Fragmentierung der DNA führt. Zum anderen erkennen Restriktionsenzyme häufig nur palindromische Sequenzen, sodass ein Schnitt an einer definierten Stelle in der DNA oft schwierig ist. Ein Ansatz für die selektive Fragmentierung von großen DNA-Stücken ist ARCUT (Artificial Restriction DNA Cutter, künstlicher Restriktions-DNA-Schneider).⁸¹ Neben der freien Sequenzwahl zeichnet sich ARCUT durch eine hohe Spezifität aus, die es z.B. möglich macht, das gesamte menschliche Genom mit etwa drei Billionen bp selektiv an einer bestimmten Stelle zu schneiden.^{82,83}

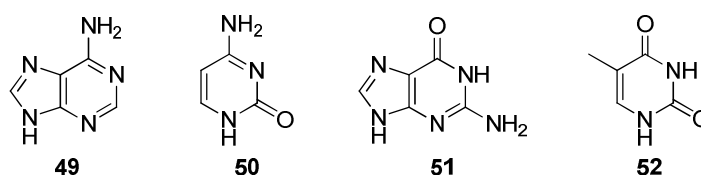


Abbildung 28: Adenin (**49**), Cytosin (**50**), Guanin (**51**) und Thymin (**52**).

1.5.1 Funktionsprinzip

Das ARCUT-System basiert auf einem Zwei-Stufen-Mechanismus.⁸⁰ Im ersten Schritt wird durch die Zugabe von pseudo-komplementären Peptidnukleinsäuren (pcPNA) ein Doppel-Duplex-Komplex mit der doppelsträngigen DNA (dsDNA) gebildet (Abbildung 29 A). Die Sequenz der pcPNA-Stränge determiniert dabei die Invasionsstelle durch die Ausbildung von Watson-Crick-Basenpaaren mit der dsDNA. Die verwendeten

pcPNA-Stränge sind gegeneinander um einige Basenpaare verschoben, sodass in der dsDNA einzelsträngige Teilstücke gebildet werden. Im zweiten Schritt werden die Phosphordiesterbindungen der Einzelstränge durch die Zugabe von einem Ce(IV)/EDTA-Komplex gespalten (Abbildung 29 B).

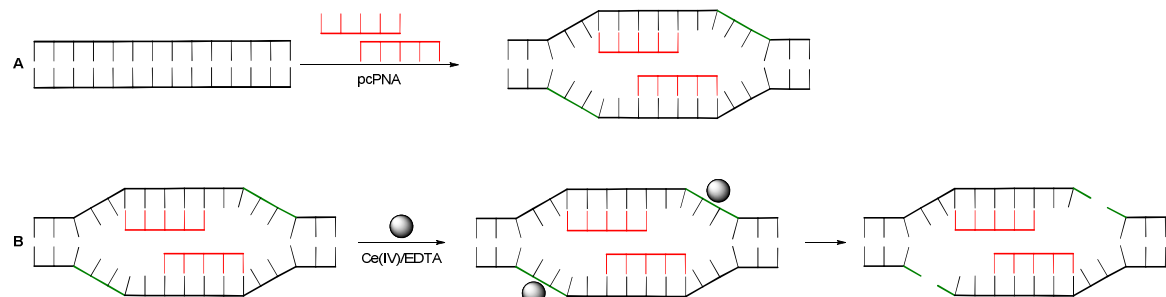


Abbildung 29: Schematische Darstellung der Funktionsweise von ARCUT: **A)** Invasion doppelsträngiger DNA durch die pcPNA unter Ausbildung eines Doppel-Duplex-Komplexes, **B)** Angriff der Ce(IV)/EDTA-Spezies auf die einzelsträngige DNA und anschließende DNA-Spaltung.

1.5.2 pcPNA-Stränge – Aufbau und Eigenschaften

Eine pcPNA ist eine modifizierte Variante der Peptidnukleinsäure (PNA), die aus synthetisierten Polyamiden (Pseudopeptiden) aufgebaut ist.^{84,85} Im Gegensatz zu dem Desoxyribose-Phosphatrückgrat in DNA, sind PNAs über achirale *N*-(2-Aminoethyl)-glycin-Einheiten verknüpft (Abbildung 30).

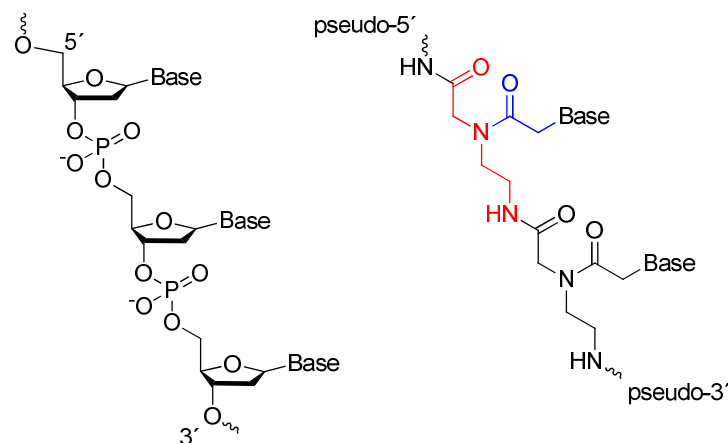


Abbildung 30: Vergleich des Aufbaus von natürlicher DNA (links) mit dem Aufbau von pcPNA (rechts); rot: *N*-(2-Aminoethyl)glycin-Einheit, blau: Methylencarbonyl-Linker.

Die Nukleinbasen sind über einen Methylencarbonyl-Linker an das Peptidrückgrat gebunden. Durch ihren strukturellen Aufbau imitiert PNA natürliche DNA. Über die vier an das PNA-Peptidrückgrat gebundenen natürlichen Nukleinbasen **49-52** (Abbildung 28) kann sie mittels Watson-Crick-Basenpaarung mit DNA wechselwirken. Der C-Terminus

der PNA ist pseudo-analog zum 3'-Ende der DNA und der N-Terminus der PNA ist pseudo-analog zum 5'-Ende der DNA gebunden

pcPNA besitzen dasselbe achirale Peptidrückgrat wie die PNA, jedoch werden neben den zwei natürlichen Nukleinbasen C (**50**) und G (**51**) die beiden Basenanaloga 2,6-Diaminopurin (**53**, D) und 2-Thiouracil (**54**, U_S) verwendet (Abbildung 31).^{86,87} 2,6-Diaminopurin (**53**) ersetzt dabei A (**49**) und unterscheidet sich durch eine zusätzliche Aminofunktion in 2-Position von A (**49**). 2-Thiouracil (**54**) ersetzt T (**52**). Strukturell unterscheidet sich U_S (**54**) von T (**52**) zum einen durch das Fehlen der Methylgruppe in der 5-Position und zum anderen ist in 2-Position ein Thiogruppe anstelle einer Oxo-Funktion eingebaut.

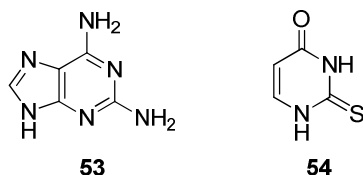


Abbildung 31: 2,6-Diaminopurin (**53**), 2-Thiouracil (**54**).

Im Vergleich zu den natürlichen Basenpaaren A-T und G-C wird das Basenpaar D-T durch eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung stabilisiert (Abbildung 32). Diese zusätzliche Stabilisierung begünstigt die Bildung des D-T-Basenpaares gegenüber der natürlichen A-T-Bindung und ist somit entscheidend für die Ausbildung des Doppel-Duplex-Komplexes zwischen dsDNA und den pcPNA (Abbildung 29). U_S (**54**) kann analog zu T (**52**) eine Basenpaarung mit A (**49**) eingehen, jedoch ohne signifikanten Vorteil gegenüber dem natürlichen A-T-Basenpaar. Da im ARCUT-System zwei zur Zielsequenz der DNA komplementäre pcPNA-Stränge eingesetzt werden, sind die beiden pcPNA-Stränge auch zwangsläufig teilweise komplementär zueinander. Dadurch wird die Doppel-Duplex-Invasion durch eine Homohybridisierung der beiden pcPNA-Stränge kompetitiv gehemmt. Unterdrückt wird die Homohybridisierung durch die repulsiven Wechselwirkungen zwischen der Thiogruppe des U_S (**54**) und der 2-Aminofunktion des D (**53**) (Abbildung 32 B rechts).⁸⁸

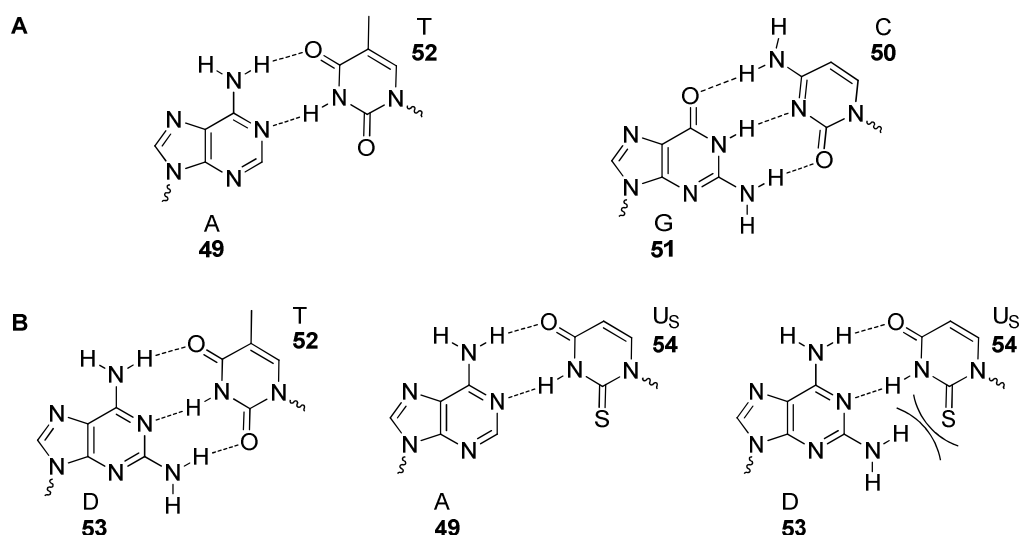


Abbildung 32: A) Watson-Crick Basenpaare: A-T (links) und G-C (rechts); B) Basenpaare D-T (links), A-U_s (mitte) und D-U_s (rechts).

An beiden Enden des pcPNA-Strangs erhöhen Lysin-Einheiten (**55**, K) dessen Polarität und verbessern damit die Wasserlöslichkeit (Abbildung 33).⁸⁸ Durch die Einführung einer Phosphoserin-Einheit (**56**) am pseudo-3'-Ende des pcPNA-Strangs wird die hydrolysierende Eigenschaft des Ce(IV)/EDTA-Komplexes verstärkt. Das Serinderivat **56** wirkt dabei rekrutierend auf den Komplex und steigert somit die Effizienz des DNA-Strangbruches um das Zwei- bis Zehnfache.⁸⁰

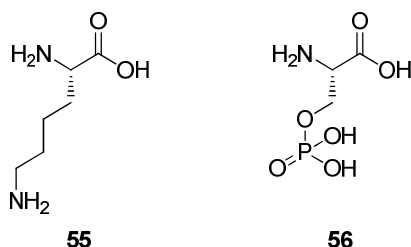


Abbildung 33: (L)-Lysin (**55**) und (L)-Phosphoserin (**56**).

Die pcPNA-Oligomere werden über eine modifizierte Merrifield-Festphasensynthese hergestellt.⁸⁸ Die *in situ* Derivatisierung des C-Terminus zum Säureamid beim Abspalten vom Trägerharz erhöht zusätzlich die Hydrophilie der Oligomere (Abbildung 34). Als Trägerharz wird polymergebundenes 4-Methylbenzhydrylaminsalz (MHBA) verwendet, bei dem der wachsende pcPNA-Strang über seinen C-Terminus gekoppelt ist.

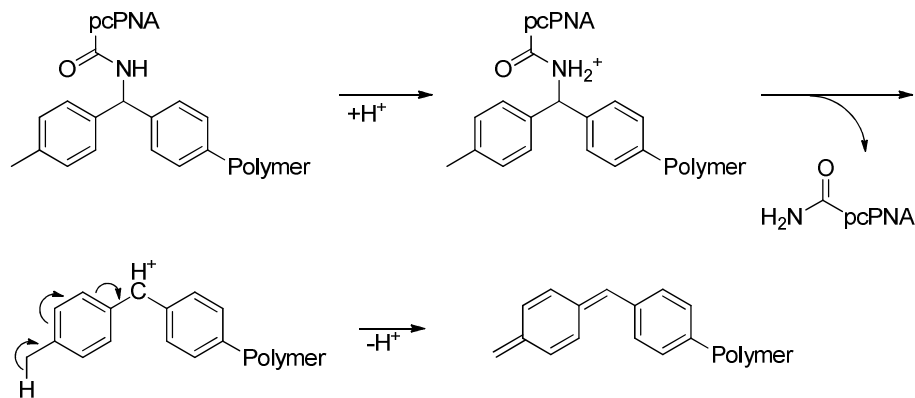


Abbildung 34: Mechanismus der säurekatalysierten *in situ* Derivatisierung des pcPNA-Oligomers beim Ablösen vom Trägerharz.

Über die pcPNA-Oligomere wird sowohl der Angriffspunkt für die DNA-Spaltung, als auch die Selektivität des ARCUT-Systems determiniert. Über die Festphasensynthese sind Oligomere mit Längen zwischen acht und 15 Nukleinbasen leicht zugänglich, sodass die Selektivität entsprechend der Größe der zu fragmentierenden DNA optimiert werden kann. Je länger die pcPNA-Sequenz ist, desto höher ist die Spezifität. Ein acht bp langes pcPNA-Paar induziert eine Ce(IV)/EDTA –katalysierte Fragmentierung der DNA alle 65 000 bp, unter der Annahme einer statistischen Verteilung der vier Nukleinbasen **49-52** in der DNA. Die Verwendung von 15-bp-Oligomeren induziert statistisch nur alle ein Milliarde bp einen DNA-Schnitt.

1.5.3 Ce(IV)/EDTA-Komplex

Im Gegensatz zu vielen anderen etablierten künstlichen DNA-Fragmentierungssystemen beruht die DNA-Spaltung beim ARCUT-System nicht auf einem radikalischen Mechanismus.⁸¹ Radikalische Spaltungsmechanismen agieren aufgrund der hohen Reaktivität der Intermediate oft unspezifisch. Die DNA-Fragmentierung durch den Ce(IV)/EDTA-Komplex beruht auf der Hydrolyse der Phosphordiesterbindungen in der DNA. Dabei katalysiert der Komplex unter physiologischen Bedingungen bevorzugt die Spaltung von Einzelstrang-DNS (engl.: Single Strand-DNA, kurz: ssDNA), wobei der genaue Mechanismus bisweilen nicht geklärt ist. Die DNA-Fragmente und deren Enden, die durch die ARCUT-basierte Spaltung entstehen, können leicht von Enzymen erkannt und weiter prozessiert werden. Somit bietet das ARCUT-System eine hervorragende Möglichkeit für einen spezifischen Strangbruch von dsDNA mit dem Vorteil der Ausbildung von physiologischen DNA-Fragmenten.

2 Zielsetzung

2.1 Untersuchung der Substratspezifität von KS-Domänen in *trans*-AT Polyketidsynthasen

Komplexe Polyketide aus Bakterien, wie z.B. Erythromycin A (**5**), Bleomycin (**42**) und FK506 (**43**) sind pharmakologisch bedeutende Naturstoffe, die von PKS gebildet werden.^{10,11} In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass neben dem Lehrbuch-PKS-Typ noch eine weitere PKS-Gruppe existiert, die *trans*-AT-PKS. Diese Enzyme, die sich evolutiv unabhängig von „Standard“-(*cis*-AT)-PKS entwickelt haben, kommen häufig in Bakterien mit ungewöhnlicher Lebensweise wie Symbionten, Pathogenen oder Anaerobiern vor und wurden daher lange übersehen.¹⁰ *Trans*-AT-PKS unterscheiden sich von *cis*-AT-PKS dadurch, dass sie biosynthetische Module mit ungewöhnlich diverser Architektur und Funktion tragen und einen hochkomplexen Aufbau aus kovalent und nichtkovalent gebundenen Einheiten besitzen. Die Funktion dieser Module und Domänen ist bisher nur schlecht verstanden, sodass grundlegende Fragen bezüglich der Biosynthese zu klären sind. Interessanterweise deuten phylogenetische Studien darauf hin, dass in Bakterien *trans*-AT-PKS häufiger durch Neukombination von Genbereichen entstehen als *cis*-AT-Systeme.²⁶ Dies lässt vermuten, dass die Nachahmung dieses Prozesses im Labor mit größerer Wahrscheinlichkeit zu neuen Polyketidstrukturen führen könnte als dies bisher für *cis*-AT-PKS der Fall ist. Neben diesen Erkenntnissen für kombinatorische Biosynthese ergaben die phylogenetischen Untersuchungen zudem, dass die Gensequenz einer KS-Domäne mit dem akzeptierten Substrat korreliert. Dieses Regelwerk ermöglicht, ähnlich dem Colinearitätsprinzip für *cis*-AT-PKS, Voraussagen von Polyketidstrukturen aus Gensequenzen. Jedoch basiert dieses Regelwerk bisweilen nur auf *In-silico*-Daten.

Das Hauptziel des Promotionsvorhabens war es, die Spezifität von KS-Domänen in *trans*-AT-PKS *in vitro* zu verifizieren. Dafür sollten *N*-Acetylcysteamin-Derivate (SNAC-Derivate) synthetisiert werden, die in Experimenten mit exprimierten KS-Domänen aus dem Bacillaen- und Psymberin-Gencluster getestet werden sollten. Phylogenetische Analysen deuten darauf hin, dass die KS-Domänen im Allgemeinen wenig tolerant gegenüber Veränderungen in der Nähe der Thioesterfunktion des Substrats sind.²⁶ Deshalb sollten die Pseudosubstrate in der α,β -Region mit den natürlichen Intermediaten übereinstimmen und die Toleranz für Modifikationen an der γ - bis ϵ -Position getestet werden. An diesen Positionen tragen die Intermediate Funktionalitäten, die allgemein von PKS-Systemen eingeführt werden können.

Zunächst sollte mit der Untersuchung der fünften KS (KS 5) innerhalb der Bacillaen-Biosynthese und der ersten (KS 1), zweiten (KS 2) und dritten (KS 3) KS innerhalb der Psymberin-Biosynthese überprüft werden, ob die *In-silico*-Vorhersagen für die Substratspezifität in der α,β -Region auch in *In-vitro*-Versuchen bestätigt werden können (Abbildung 35).

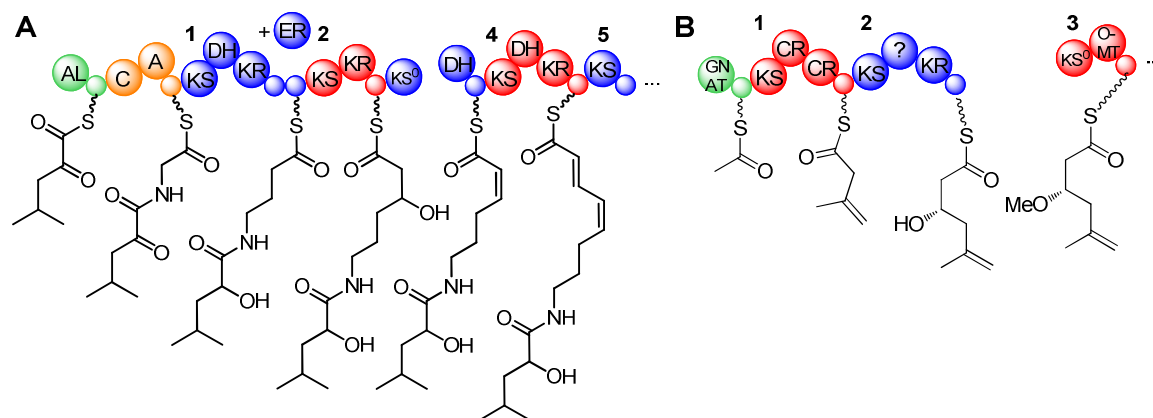


Abbildung 35: A) Ausschnitt aus der Bacillaen-Biosynthese, B) Ausschnitt aus der Psymberin-Biosynthese; nummeriert sind die KS-Domänen, deren Substratspezifität getestet werden sollte.

Für die Untersuchungen der KS sollten die kurzketigen SNAC-Substrate **57a** und **57b** synthetisiert werden (Abbildung 36 A). Die Substrate **58-63** wurden für die Studie im Rahmen eines anderen Promotionsprojekts dargestellt (Abbildung 36 B).

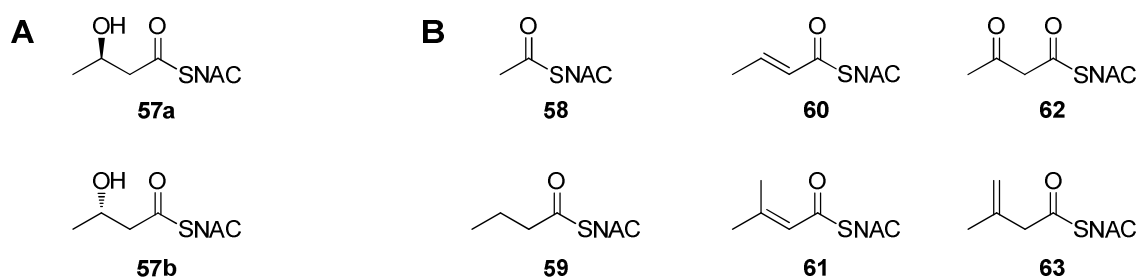


Abbildung 36: A) Substrate **57a** und **57b**, die im Rahmen dieser Promotion für die Untersuchung der Substratspezifität synthetisiert werden sollten; B) Substrate **58-63** die im Rahmen einer anderen Promotion synthetisiert wurden.

Nach dem „Proof-of-Principle“ sollten die Bacillaen KS 1, KS 2 und KS 4 mit unterschiedlichen Substratspezifitäten auf deren Substrattoleranz untersucht werden (Abbildung 35 A). Die anderen Module der Biosynthese sind entweder schwierig zu analysieren, da dies Synthesen von komplexen, instabilen Substanzen erfordert, oder sie sind von geringerem Interesse für die kombinatorische Biosynthese. Dabei sollten sowohl Volllängensubstrate, als auch verkürzte Analoga getestet werden. Die verkürzten

Substrate sind zum einen synthetisch leichter zugänglich, zum anderen geht aus den phylogenetischen Studien hervor, dass die Spezifität der KS nur bis zur ϵ -Position reicht.

Für die KS 1 in Modul 2 wird erwartet, dass nur acylierte Aminosäuren akzeptiert werden. Daher sollte mit den Vollängen-Substraten **64b** und **64c** die Toleranz der KS 1 in Hinblick auf verschiedene Aminosäuren untersucht werden (Abbildung 37). Das natürliche Substrat **64a** dient dabei als Standard. Diese Synthese sollte dabei anhand der üblichen Methoden der Peptidsynthese erfolgen. Mit den SNAC-Derivaten **65-67** sollte der Einfluss der verschiedenen Funktionalitäten im natürlichen Intermediat getestet werden. Anhand des Substrats **68** sollte der Einfluss einer zusätzlichen Methylengruppe analysiert werden. Da der Zeitpunkt der Reduktion der δ -Ketogruppe zur δ -Hydroxyfunktion nicht eindeutig geklärt ist, sollte mit Substrat **69** untersucht werden, ob KS 1 eine Präferenz zu einem der beiden Substrate **64a** oder **69** aufweist. Mit den Substraten **70** und **71** sollte die Akzeptanz von Heteroaromaten getestet werden. KS 1 prozessiert das Substrat eines NRPS-Moduls, die bekannt für die Produktion von Heteroaromaten wie Thiazol und Oxazol sind (vgl. 14).

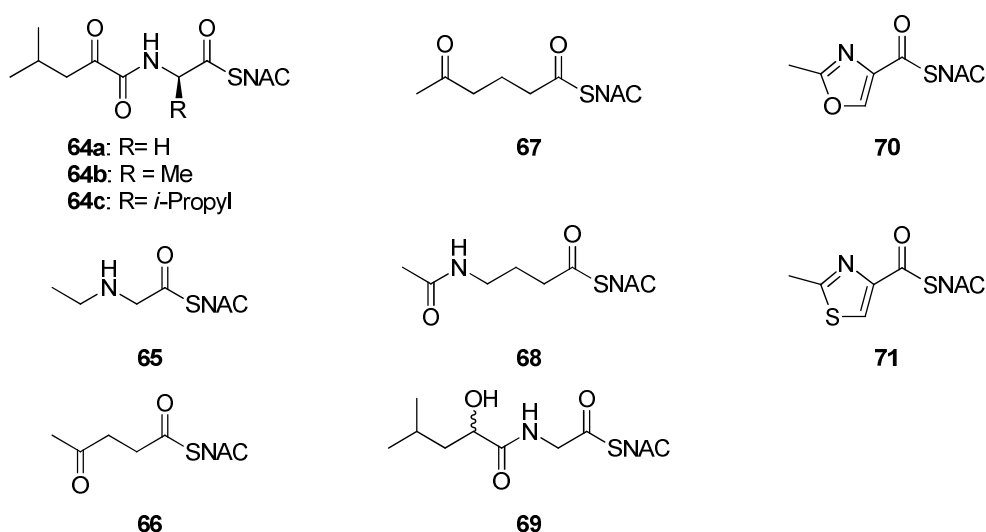


Abbildung 37: Substrate **64a-c** und **65-71** für die Untersuchung Substratspezifität der KS 1.

Analog zu der Analyse der KS 1 sollte die KS 2 auf ihre Substratspezifität untersucht werden. Auch hier sollte der SNAC-Ester **72** als Referenz synthetisiert werden (Abbildung 38). Weiterhin sollte mit den Substraten **73-75** getestet werden, ob die Substratspezifität nach der β -Position signifikant relaxiert. Die Synthese der Substrate sollte wiederum unter Standard-Peptidkupplungsverfahren erfolgen.

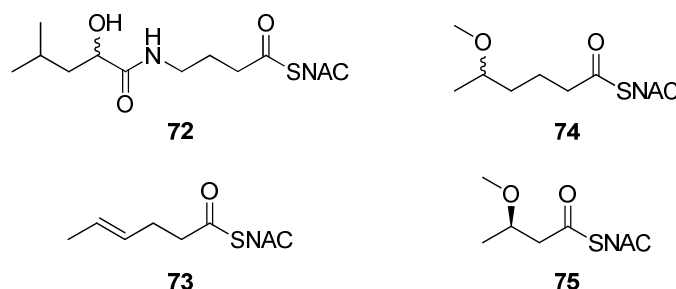


Abbildung 38: Substrate **72-75** für die Untersuchung der Substratspezifität der KS 2.

Die Untersuchung der KS 4 der Bacillaen-Biosynthese sollte Aufschlüsse über eine KS-Domäne liefern, die ein α,β -ungesättigtes Substrat prozessiert (Abbildung 35 A). Auch hier sollte Substrat **76** als Referenz dienen, da es das natürliche Intermediat imitiert (Abbildung 39). Substrat **77** sollte Erkenntnisse bezüglich der Konfigurationsspezifität liefern, und die Substrate **78** und **79** sollten zur Analyse der γ - bis δ -Position dienen.

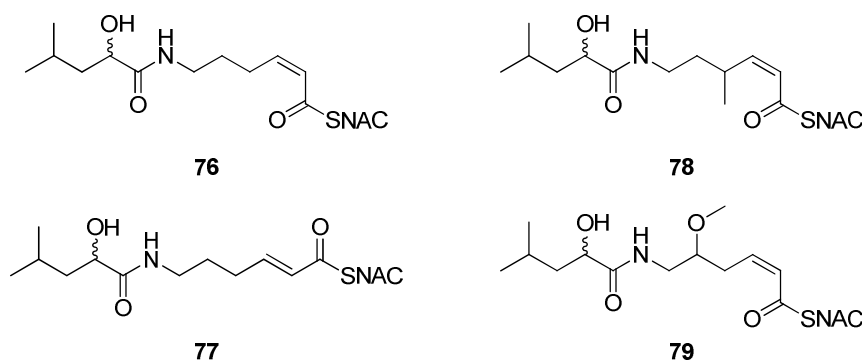


Abbildung 39: Volllängensubstrate **76-79** für die Untersuchung der KS 4 der Bacillaen-Biosynthese.

Exemplarisch ist der Retrosyntheseplan für die Synthese des Thioesters **76** gezeigt (Abbildung 40). Zunächst sollte die Hydroxygruppe der Säure **80a** als Acetat geschützt werden. Anschließend sollte mittels einer Peptidkupplungsreaktion zwischen der Säure **80b** und dem O-geschützten Amin **81** das geschützte Amid **82a** dargestellt werden. Nach der selektiven Entschützung zum primären Alkohol **82b**, sollte dieser zum Aldehyd **83** oxidiert werden. Mit einer für (*cis*)-Konfiguration selektiven Olefinierungsreaktion sollte der ungesättigte Ester **84a** dargestellt werden. Nach der Entfernung aller Schutzgruppen sollte die Säure **84b** unter Peptidkupplungsbedingungen in die Zielverbindung **76** überführt werden. Durch Variationen der Reaktionsbedingungen oder der verwendeten Edukte sollten die Thioester **77** und **78** in Analogie zur Synthese des Substrats **76** synthetisiert werden.

Für die Synthese des Substrats **79** sollte zunächst das Amin **89b** dargestellt werden (Abbildung 41). Ausgehend von *N*-Boc-Glycinal (**85**) sollte mittels einer Grignard-Reaktion mit 3-Bromprop-1-in (**86**) der sekundäre Alkohol **87a** synthetisiert werden. Nach der Methylierung der Hydroxygruppe zum Ether **87b** sollte baseninduziert der Alkinester **88** dargestellt werden. Danach sollte das Alkin **88** selektiv zum *cis*-konfigurierten Alken **89a** hydriert und anschließend säurekatalysiert zum primäre Amin (**89b**) entschützt werden. Das Amin **89b** sollte dann in drei Stufen unter Standardbedingungen zum Substrat **79** umgesetzt werden.

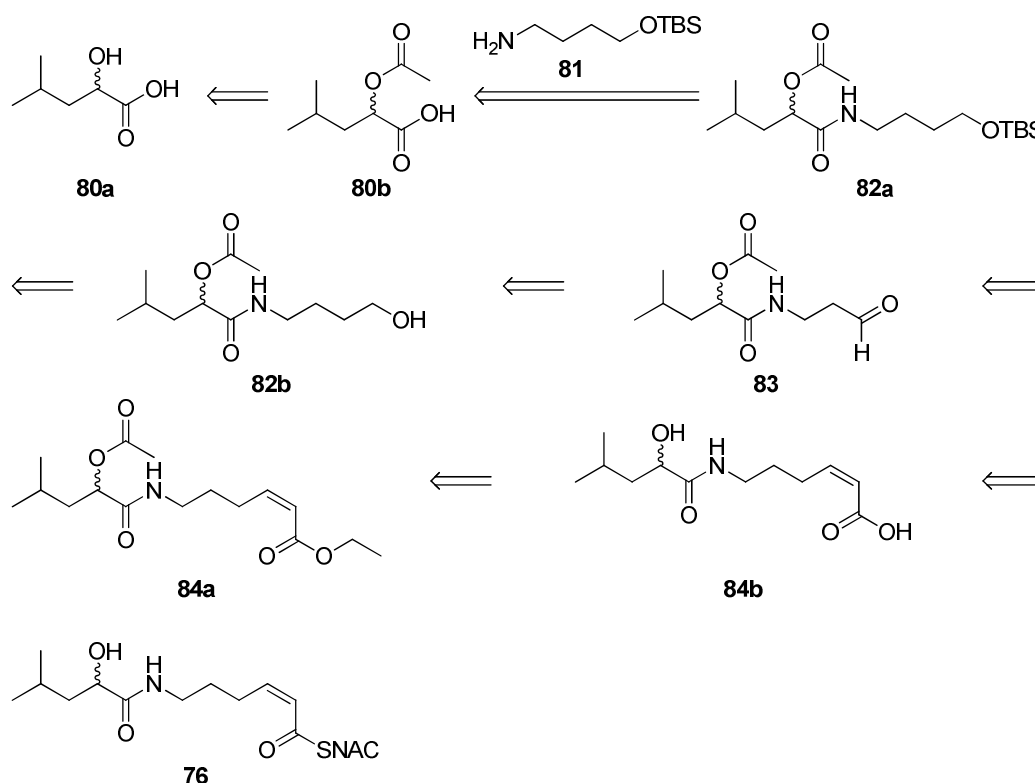


Abbildung 40: Retrosynthese des SNAC-Thioesters **76**.

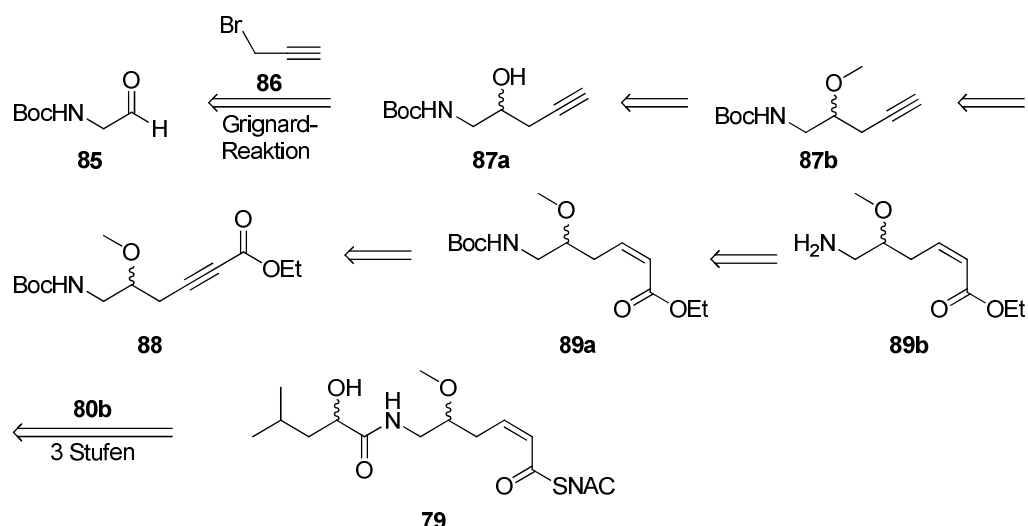


Abbildung 41: Retrosynthese des Thioesters 79.

2.2 Synthese von Substraten zur Untersuchung der Pyranbiosynthese in der Misakinolid A-PKS

Der *trans*-AT-Metabolit Misakinolid A (**24**) wurde aus dem Schwamm *Theonella swinhoei* isoliert. Dabei ist der eigentliche Produzent wahrscheinlich ein symbiotisches δ -Proteobakterium.³¹ Im Rahmen der Promotionsarbeit von Dr. Agustinus Uria in der AG Piel wurde die Biosynthese eingehend untersucht und eine putative Biosynthese postuliert (siehe Abbildung 13). Jedoch ist der Zeitpunkt der Bildung des zweiten Pyranrings nicht eindeutig geklärt. Es wird vermutet, dass eine Pyransynthese (PS) in Modul 15 der Biosynthese die intramolekulare Addition der ζ -Hydroxygruppe an der β -Position katalysiert (Abbildung 42).

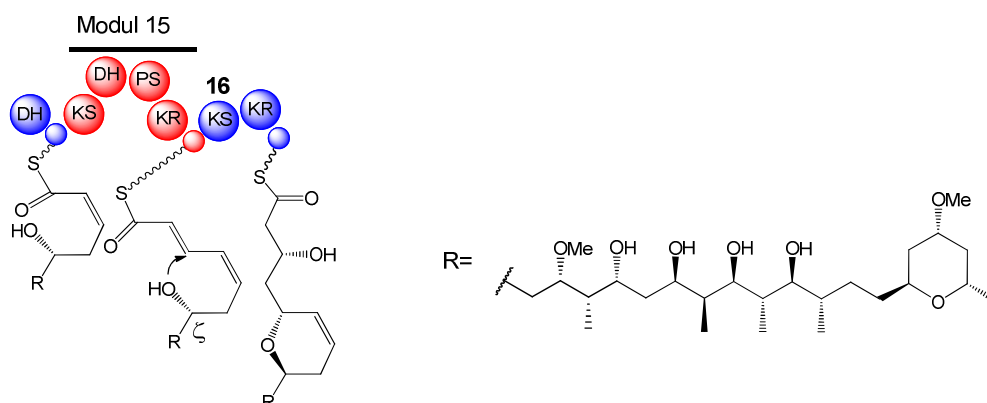


Abbildung 42: Ausschnitt aus der Misakinolid A Biosynthese.

Tetra- oder Dihydropyranreste wurden auch in anderen *trans*-AT-Polyketiden gefunden, beispielsweise im Psymberin (**47**) (siehe Abbildung 26).⁷² Dabei weisen Module, die die

zyklischen Struktur motive in den Polyketiden einbauen, eine charakteristische Domänenanordnung auf.⁸⁹ Nach der Kettenverlängerung katalysiert durch die KS und der KR-vermittelten Reduktion, dehydriert eine klassische DH das β -Hydroxyintermediat zum α,β -ungesättigten Intermediat.²⁵ Anschließend katalysiert die PS eine intramolekulare Ringschlussreaktion. Bislang wurde biochemisch die postulierte Funktion der PS aber noch nicht nachgewiesen. Deshalb untersucht Petra Pöplau (AG Piel) in laufenden Studien die katalytische Aktivität von PS *in vitro*. Für die Proteinassays mit der exprimierten PS-Domäne aus der Misakinolid-Biosynthese sollten die Substrate **90** und **91** synthetisiert werden (Abbildung 43).



Abbildung 43: Substrate **90** und **91** für die Präferenzanalyse der Misakinolid KS 16.

Die Synthese des primären Alkohols **97b** sollte analog der literaturbekannten Synthese erfolgen (Abbildung 44).^{90,91} Nach der TBS-Schützung von 1,3-Propandiol (**92a**) sollte die freie Hydroxygruppe des Diols **92b** zum Aldehyd **93** oxidiert werden. Anschließend sollte durch eine nukleophile Addition des zuvor als Silylether geschützten Alkins **94b** am Aldehyd **93** der sekundären Alkohol **95a** hergestellt werden. Dieser sollte nach basenkatalysierter Entschützung zum Diol **95b** unter Lindlar-Bedingungen zum Z-Olefin **96a** hydriert werden. Im Folgenden sollte die primäre Hydroxygruppe als Tosylat **96b** aktiviert werden. Durch eine baseninduzierte, intramolekulare Substitutionsreaktion sollte das Pyranderivat **97a** dargestellt werden. Nach der Entschützung der primären Hydroxygruppe sollte der Alkohol **97b** unter Jones-Bedingungen in einer Stufe zur Säure **98** oxidiert werden. Im letzten Schritt sollte unter Standard-Kupplungsbedingungen die Säure **98** zum Thioester **90** derivatisiert werden.

Das offenkettige Substrat **91** sollte ausgehend von But-3-in-1-ol (**94a**) synthetisiert werden (Abbildung 45). Nach der Schützung der Hydroxygruppe zum Silylether **94c** sollte das Alkinol **100** durch eine baseninduzierte Addition des Alkins **94c** an Formaldehyd (**99**) dargestellt werden. Anschließend sollte durch die Kombination aus Oxidation und Wittig-Olefinierung der ungesättigte Ester **101a** synthetisiert werden. Nach Verseifung des Esters **101a** zur Säure **101b** sollte diese in den Thioester **102a** überführt werden. Durch die Abspaltung der Silylschutzgruppe sollte das Alkin **103b** dargestellt werden, das dann selektiv zum Dien-Substrat **91** hydriert werden sollte. Das verlängerte

Michael-System sollte bewusst spät installiert werden, da es anfällig für nukleophile Additionen ist.

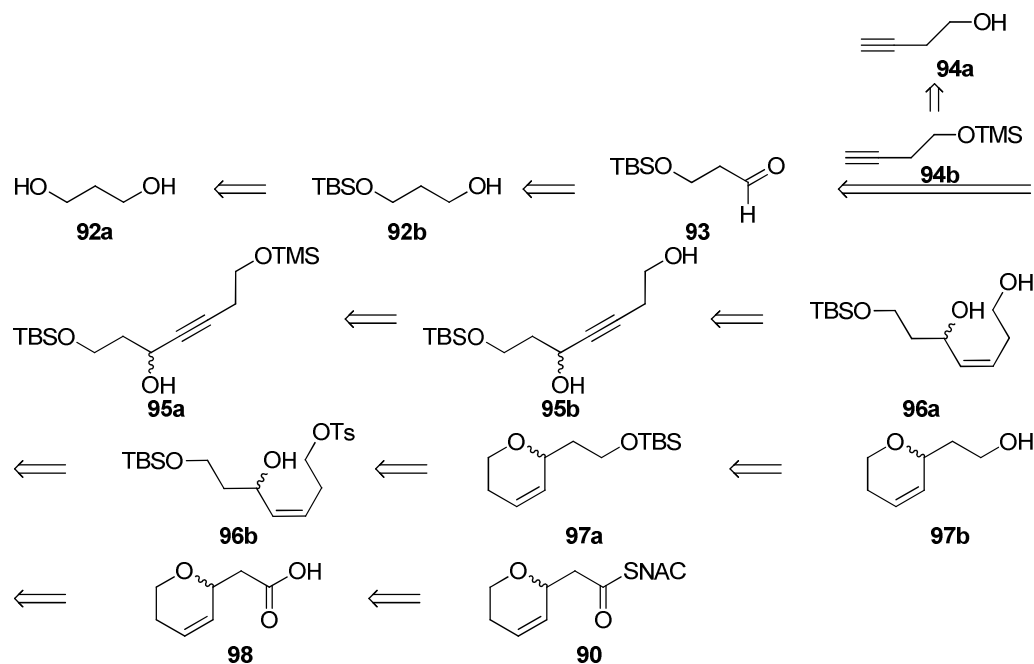


Abbildung 44: Retrosynthese des Pyransubstrats **90**.

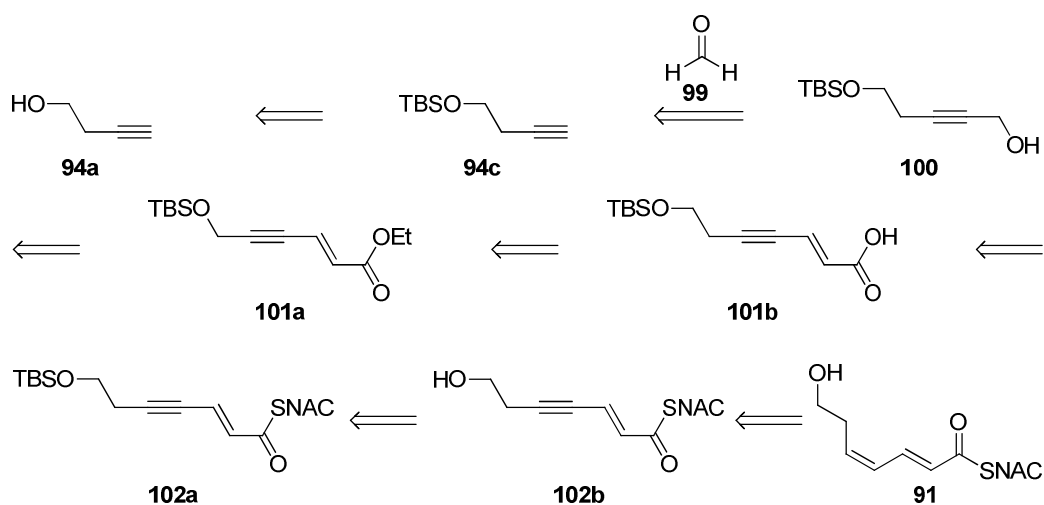


Abbildung 45: Retrosynthese des Substrats **91**.

2.3 Synthese von *cis*-Propenylprolin zur Untersuchung der Hormaomycin-Biosynthese

Mit *cis*-Propenylprolin ist eine, bislang in der Natur einzigartig, nicht-proteinogene Aminosäure im Hormaomycin (**32**) eingebaut (siehe Abbildung 19).⁵¹ Für laufende Studien zur Biosynthese des Naturstoffes **32** von Xiaofeng Cai (AG Piel) sollte *cis*-(*Z*)-4-Propenylprolin synthetisiert werden. Durch Fütterungsexperimente mit dem

synthetisierten Baustein sollten neue Einblicke in bislang nicht identifizierte Funktionen von, in der Hormaomycin-Biosynthese involvierten, Genen erlangt werden. Weiterhin sollte in Arbeiten von Dr. Max Crüsemann (AG Piel) durch *In-vitro*-Experimente, unter anderem mit der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Aminosäure, die Substratspezifität der A-Domänen untersucht werden. Informationen zu deren Substrattoleranz geben wichtige Hinweise zum Potential der mutasynthetischen Generierung von Hormaomycinanaloga.

Dabei sollte *cis*-(*Z*)-4-Propenylprolin Hydrochlorid (**109**) analog zur literaturbekannten Synthese hergestellt werden (Abbildung 46).⁹² Ausgehend von dem kommerziell erhältlichen Prolinderivat **103** sollte zunächst die Säurefunktion zum primären Alkohol **104a** reduziert werden. Nach der selektiven Schützung zum Silylether **104b** sollte die sekundäre Hydroxygruppe als Mesylat **104c** aktiviert werden. Unter S_N2-Bedingungen sollte das Mesylat **104c** in das Nitril **105** überführt werden, das im Folgenden zum Aldehyd **106** reduziert werden sollte. Anschließend sollte mittels Wittig-Reaktion der Aldehyd **106** zum Olefin **107a** umgewandelt werden. Nach der Abspaltung der Silylschutzgruppe sollte der primäre Alkohol **107b** zur Säure **108** oxidiert werden. Im letzten Schritt sollte durch saure Entschützung der Aminogruppe das Prolinderivat **109** dargestellt werden.

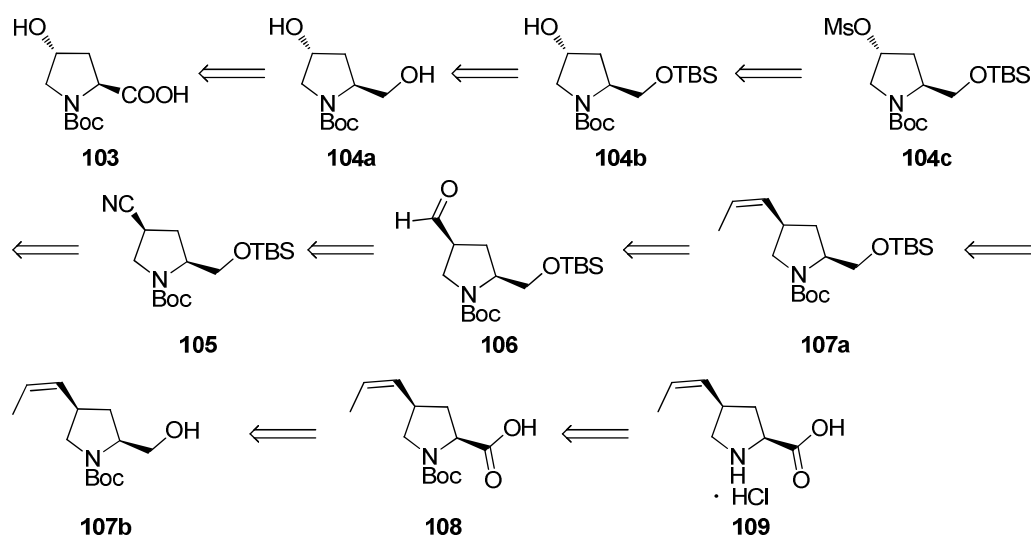


Abbildung 46: Retrosynthese des Prolinderivats **109**.

2.4 Synthese von pcPNA-Strängen zur ARCUT-basierten DNA-Schnitt im Psymberin-Gencluster

Das hochpotente, antikanzerogen-wirkende Psymberin (**47**) wird von einem NRPS-PKS-Hybrid gebildet.⁶⁸ Jedoch ist das Psymberin-produzierende Bakterium unter

dem aktuellen Stand der Technik nicht kultivierbar. Aufgrund metagenomischer Studien wurde postuliert, dass *psyA* und *psyD* für die Biosynthese des Polyketidgrundgerüsts vom Metaboliten **47** kodieren (siehe Abbildung 26).⁷² Für weitere Studien sollte *psyD*-DNA selektiv an ihrem Ende gespalten werden. Da Restriktionsenzyme für diese Experimente zu unspezifisch spalten, sollte das ARCUT-System eingesetzt werden. Diese Methode ermöglicht eine hochselektive DNA-Spaltung, die über die Sequenzen der verwendeten pcPNA-Oligomere gesteuert werden kann. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zwei pcPNA-Oligomere zu synthetisieren, die in Folgearbeiten mittels ARCUT-System für die gezielte Manipulation der *psyD*-DNA genutzt werden sollten.⁸¹ Dabei sollte das GFP-Reportergen (grün-fluoreszierende Protein-Reportergen) hinter die *psyD*-Gensequenz ligiert werden, um eine Koexpression von Gen und Reporter zu ermöglichen. Nach der heterologen Expression des modifizierten Genclusters in *E. coli* kann durch die Intensität der Fluoreszenz des GFP die Produktion von Psymberin (**47**) im heterologen Wirt verfolgt werden. GFP fluoresziert nur bei der korrekten Faltung des Proteins.⁹³ Dementsprechend können die Kultivierbedingungen anhand der Fluoreszenz dahingehend optimiert werden, dass das Psymberin-produzierende Protein produziert und damit die Bioverfügbarkeit von Psymberin (**47**) verbessert wird. Darüber hinaus sollte auch für folgende Arbeiten, in denen eine gezielte Manipulation großer DNA-Fragmente gefordert ist, das ARCUT-System für die spezifische DNA-Spaltung etabliert werden.

Für die Synthese der pcPNA-Oligomere sind die Bausteine C_M **110**, G_M **111**, L_M **112** und P_M **113** kommerziell erhältlich (Abbildung 47). Sowohl das Diaminopurin-Monomer (D_M) **115b**, als auch das Thiouracil-Monomer (U_{S,M}) **118b** sind nicht erwerbbar und sollten daher für die Festphasensynthese hergestellt werden (Abbildung 48, Abbildung 49).⁸⁸

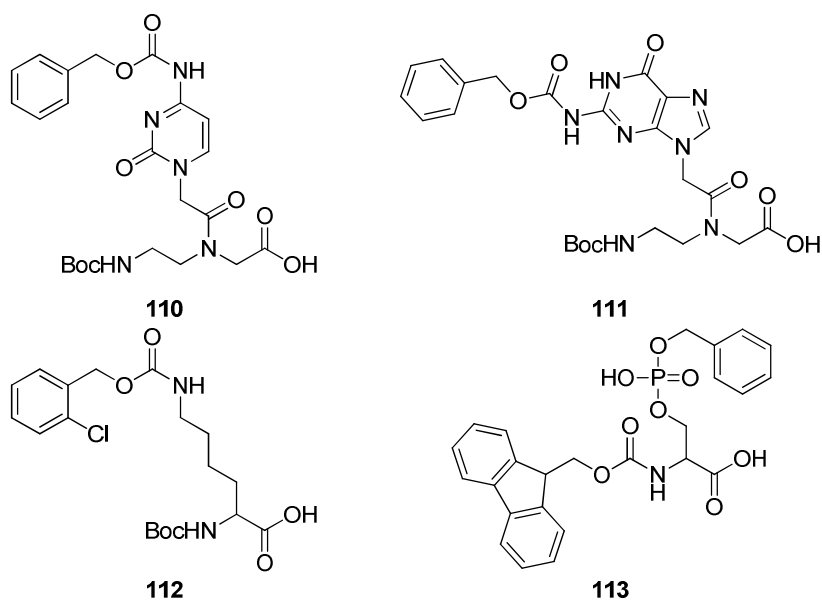


Abbildung 47: Kommerziell erhältliche Monomere **110-113** für die pcPNA-Oligomer-Synthese.

D_M **115b** sollte analog einer literaturbekannten Synthese in fünf Stufen ausgehend von 2,6-Diaminopurin (**53**) hergestellt werden (Abbildung 48).⁸⁸ $U_{S,M}$ **118b** sollte ausgehend von 2-Thiouracil (**54**) in fünf linearen Stufen dargestellt werden (Abbildung 49).⁸⁸

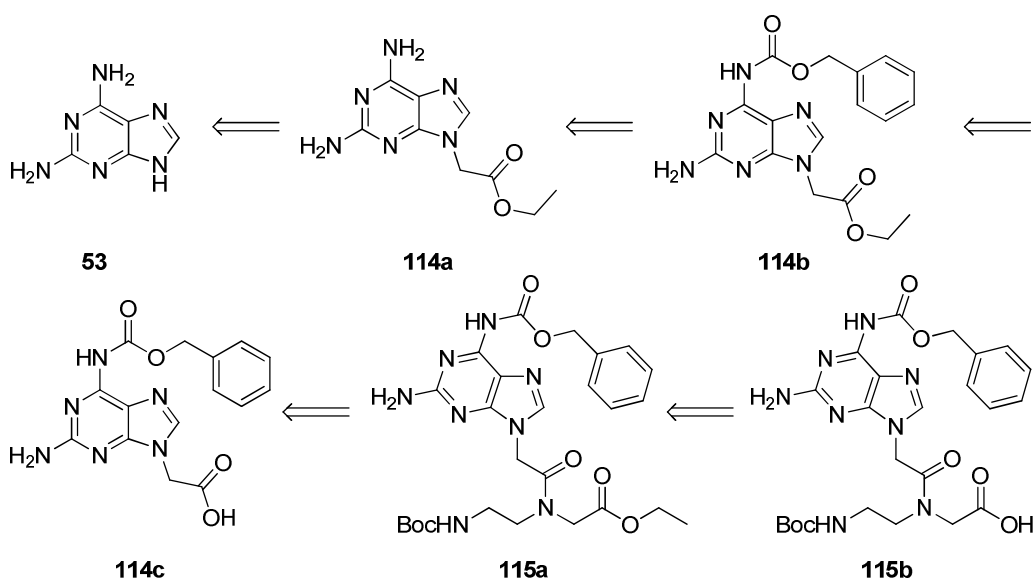


Abbildung 48: Retrosynthese des D_M **115b**.

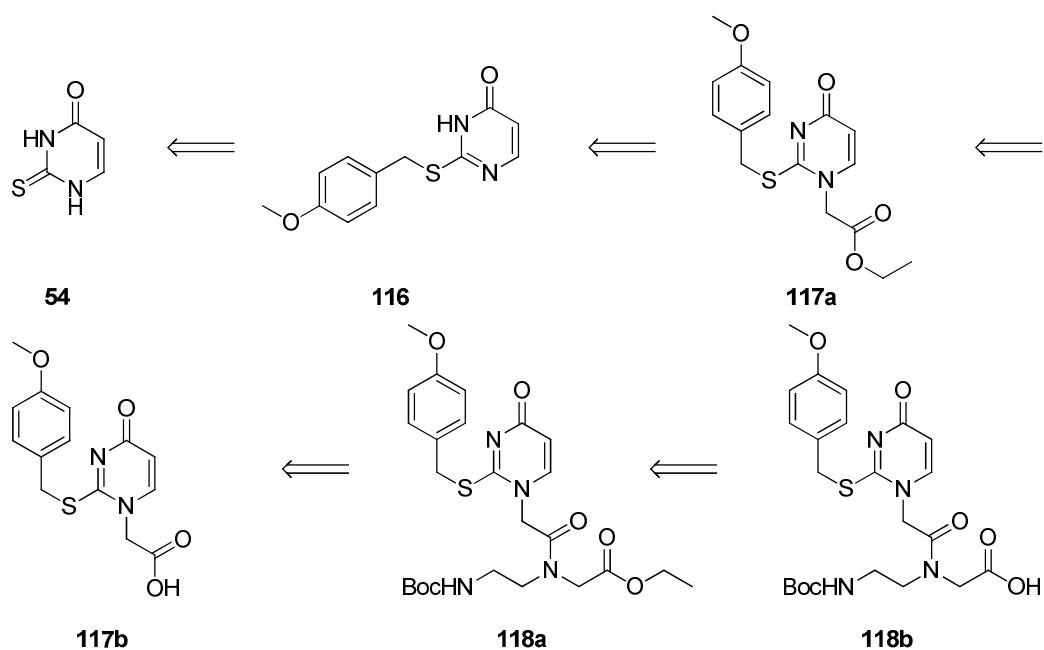


Abbildung 49: Retrosynthese des $U_{S,M}$ 118b.

Anschließend sollte in der *psyD*-DNA eine für den ARCUT-Einsatz geeignete Zielsequenz ermittelt werden, die nach der DNA-Spaltung die Insertion der GFP-DNA erlaubt. Zwei zur DNA komplementäre pcPNA-Oligomere sollten dann mittels der modifizierten Merrifield-Festphasensynthese hergestellt werden.⁸⁸

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Studien zur Substratspezifität in *trans*-AT Polyketidsynthasen

Das antibiotisch aktive Polyketid Bacillaen (**22**) wird unter anderem von *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42 produziert. Die Analyse der zugrundeliegenden *trans*-AT-PKS zeigte, dass der Aufbau der Bacillaen-PKS von dem der typischen Lehrbuch-PKS stark abweicht. Neben ungewöhnlichen Domänenabfolgen führte vor allem das Fehlen von AT-Domänen in den Modulen dieser und weiterer PKS zu einer Differenzierung innerhalb der Typ-I-PKS: PKS, bei denen die AT-Domänen in die Module integriert sind, werden als *cis*-AT-PKS bezeichnet, wohingegen freistehende AT-Domänen *trans*-AT-PKS charakterisieren.^{24–26} Das für *cis*-AT-PKS etablierte Colinearitätsprinzip ist bei *trans*-AT-PKS oft nicht anwendbar, sodass die Voraussage der Funktion neuer *trans*-AT-Cluster schwierig bis unmöglich war. Anhand einer phylogenetischen Analyse von KS-Domänen in *trans*-AT-Systemen wurde eine Korrelation zwischen der Gensequenz einer KS und der Struktur des durch diese KS prozessierten Substrats gefunden.²⁶ Diese Relation dient bereits als Grundlage für ein *trans*-AT-Colinearitätsprinzip, mit dem die Analyse von *trans*-AT-PKS signifikant erleichtert wurde. Die entdeckte Korrelation könnte aber auch wichtige Erkenntnisse zum Potential der kombinatorischen Biosynthese mit *trans*-AT-PKS liefern. Jedoch basieren die bisherigen Ergebnisse auf *In-silico*-Daten, sodass die Substratspezifität noch mit funktionalen Daten zu verifizieren ist. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Substratspezifität verschiedener KS-Domänen aus *trans*-AT-PKS *in vitro* untersucht.

3.1.1 *In-vitro*-Methode und Proof-of-Principle

Für die *In-vitro*-Analyse der Substratspezifität von *trans*-AT-KS wurde von der AG Piel in einer Kooperation mit der AG Oldham (Universität Nottingham, UK) eine neue Methode entwickelt (Abbildung 50).⁹⁴ Diese basiert auf der zeitlich aufgelösten Massenanalyse von Proteinassays. Nach der Expression einer KS-Domäne wurde die Masse des Proteins mittels Elektronensprayionisierungs-Massenspektrometrie (ESI-MS) bestimmt. Anschließend wurde das Protein mit verschiedenen SNAC-Substraten inkubiert. Der *N*-Acetylcysteaminrest initiiert Coenzym A (**11**), das normalerweise die Acylbausteine während der Biosynthese aktiviert. Somit erkennt bei passendem Acylrest das Protein die inkubierten SNAC-Derivate und bindet diese kovalent durch die Ausbildung einer Thioesterbindung. Das Protein akzeptiert nur Substrate zu seiner Spezifität passen. Die

Beladung des Proteins mit dem inkubierten Substrat wurde an verschiedenen Zeitpunkten beobachtet. Dafür wurden die Assays säurekatalysiert gestoppt, entsalzt und massenspektrometrisch analysiert. Die Acylierung wurde über einen Zeitraum von 50 Minuten beobachtet. Aus dem Quotienten der relativen Signalintensitäten der acylierten und der nicht-acylierten Domäne wurden jeweils die Acylierungsraten der getesteten Substrate berechnet und graphisch gegeneinander aufgetragen.

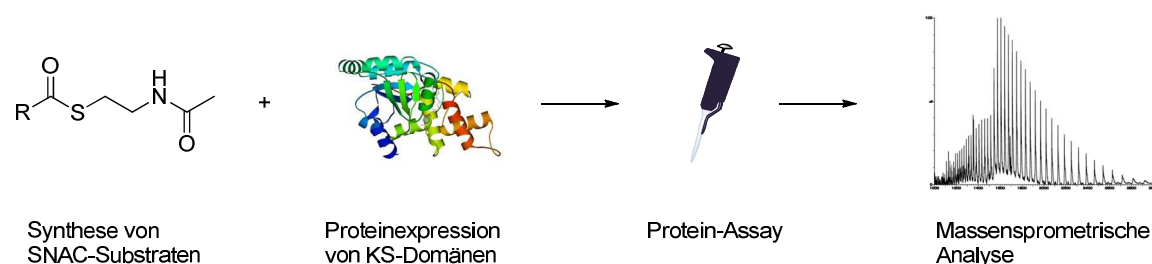


Abbildung 50: *In-vitro*-Methode zur Analyse der KS-Substratspezifität.

Für ein Proof-of-Principle der *In-vitro*-Methode wurde eine Reihe an repräsentativen, kurzkettigen Substraten **57a,b** und **58-63** synthetisiert. Die Substrate **58-63** wurden von Sarah Frank aus der AG Piel synthetisiert. Die β -Hydroxysubstrate **57a** und **57b** wurden ausgehend von den kommerziell erhältlichen Säuren **119a** und **119b** in vergleichbaren Ausbeuten zur Literatur synthetisiert (Abbildung 51).⁹⁵

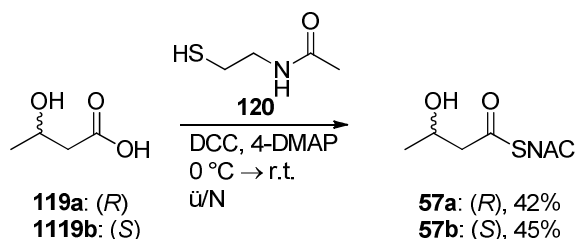


Abbildung 51: Synthese der β -Hydroxysubstrate **57a, b**; DCC: *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid, 4-DMAP: 4-(Dimethylamino)pyridin, r.t.: Raumtemperatur, ü/N: über Nacht.

In einer Kooperation mit der Universität Nottingham (Matthew Jenner und Dr. Neil Oldham) wurden die Substrate **57a,b** und **58-63** mit den exprimierten KS 1, KS 2 und KS 3 des Psymberin-Clusters und der KS 5 der Bacillaen-PKS inkubiert und mittels ESI-MS untersucht.⁹⁴ Als Beispiel ist die ESI-MS-Analyse des Proteinassays der Bacillaen KS 5 mit Thioester **60** gezeigt (Abbildung 52). Zu Beginn ($t = 0$ min) wurde nur die Masse der unbeladenen Domäne ($[\text{KS5}+47\text{H}]^{47+}$) detektiert. Im Verlauf der Inkubation wurde die Domäne von dem Substrat **60** acyliert. Nach 20 Minuten wurde nur noch die Masse der beladenen Domäne ($[\text{Acyl-KS5}+47\text{H}]^{47+}$) gemessen.

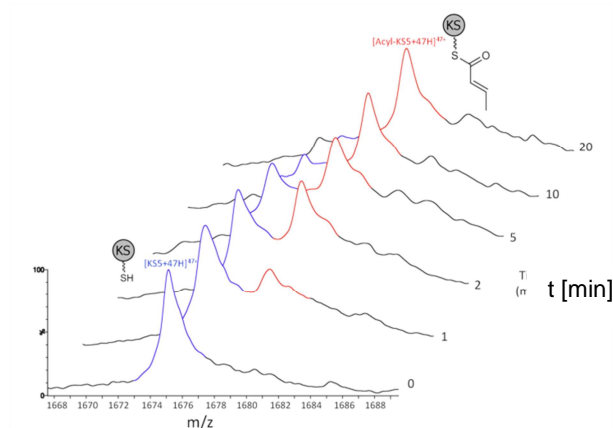


Abbildung 52: Zeitlich aufgelöste Massenänderung der exprimierten KS 5 der Bacillaen-PKS während der Inkubation mit Substrat 60.

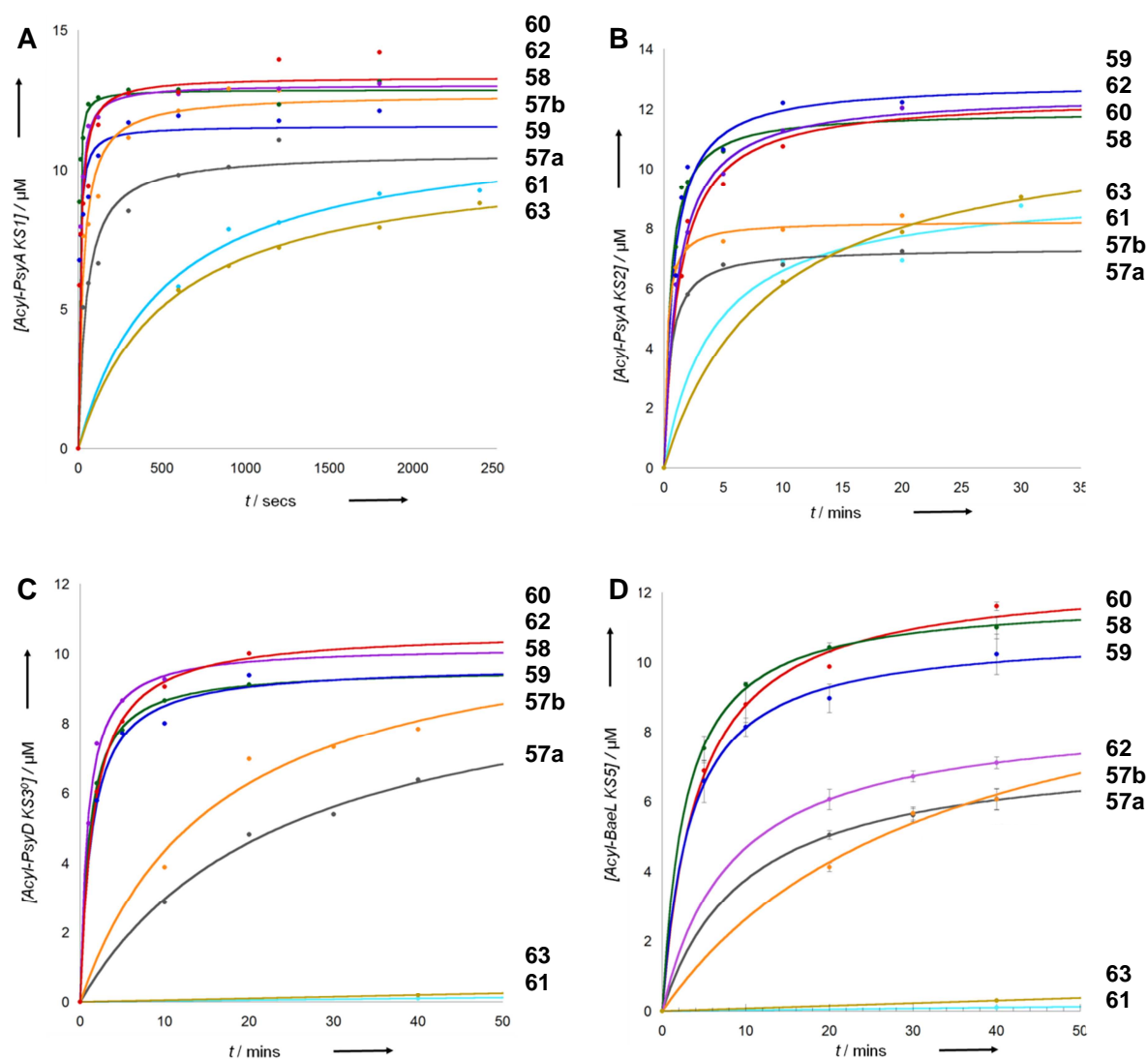


Abbildung 53: Zeitaufgelöste Acylierung mit den Substraten 57a, 57b, 58-63; A) Psymberin KS 1, B) Psymberin KS 2, C) Psymberin KS 3, D) Bacillaen KS 5.

Für die KS 1-Domäne der Psymberin-PKS wurde eine hohe Substratspezifität erwartet, da sie zum einen am Anfang der Biosynthese lokalisiert ist und zum anderen ein kleines Substrat prozessiert (vgl. Abbildung 35 B). Jedoch zeigten die Ergebnisse der Proteinassays mit den Substraten **57a,b**, **58-63** das Gegenteil. Alle getesteten Substrate **57a,b**, **58-63** wurden von der KS-Domäne akzeptiert (Abbildung 53, Tabelle 1). Neben dem natürlichen Substrat **58** wurden die aliphatischen Analoga **59** und **60** in vergleichbaren Raten zum Thioester **58** prozessiert. Daraus lässt sich folgern, dass die Kettenlänge nicht der determinierende Faktor für die Spezifität dieser KS-Domäne ist. Weiterhin acylierten die β -Sauerstoff-verzweigten Substrate **57a,b** und **62** im Gegensatz zu den β -Kohlenstoff-verzweigten Substraten **61** und **63** um den Faktor 30 schneller, sodass es trotz der niedrigen Spezifität Präferenzen bezüglich β -Sauerstoff-funktionalisierter Substrate gibt.

Tabelle 1: Initiale Acylierungsraten der Substrate **57a,b** und **58-63** mit der Psymberin KS 1, KS 2, KS 3 und Bacillaen KS 5 berechnet aus $\ln([KS]/[KS_0])$; *N.D.*: keine detektierbare Acylierung während der Inkubation; *SNAC-Thioester, der das putative natürliche Intermediat der KS imitiert; geschätzter Fehler: $\pm 0.005 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$.

| Substrat | Initiale Acylierungsrate [$10^{-6} \text{ mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$] | | | |
|------------|---|-------|-------------|---------------|
| | Psymberin-PKS | | | Bacillaen-PKS |
| | KS 1 | KS 2 | KS 3 | KS 5 |
| 57a | 0.40 | 0.10 | 0.02 | 0.01 |
| 57b | 0.70 | 0.30 | 0.03 | 0.01 |
| 58 | 3.00* | 0.30 | 0.30 | 0.07 |
| 59 | 2.00 | 0.30 | 0.10 | 0.06 |
| 60 | 2.00 | 0.30 | 0.20 | 0.07* |
| 61 | 0.04 | 0.03 | <i>N.D.</i> | <i>N.D.</i> |
| 62 | 2.00 | 0.30 | 0.20 | 0.02 |
| 63 | 0.03 | 0.03* | <i>N.D.</i> | <i>N.D.</i> |

Eine ähnlich breite Substrattoleranz weist die Psymberin KS 2 auf. Alle inkubierten Substrate **57a**, **57b** und **58-63** acylierten die Domäne (Abbildung 53). Jedoch wurden die unverzweigten Substrate **58-60** und das β -Ketosubstrat **62** im Vergleich zu den β -verzweigten Substraten **57a,b**, **61** und **63** besser akzeptiert (Tabelle 1). Grund hierfür ist wahrscheinlich der geringere sterische Anspruch der unverzweigten Thioester **58-60** und **62**.

Die KS 3 des Psymberin-Clusters ist laut Vorhersage eine nicht-verlängernde KS, die ein (S)- β -Hydroxyintermediat prozessiert. Die Studie zeigte, dass sowohl die unverzweigten Substrate **58-60**, als auch die β -Sauerstoff-funktionalisierten Substrate **57a, b**, **62** von der Domäne toleriert werden (Abbildung 53 C, Tabelle 1). Im Gegensatz dazu wurde bei

den β -Kohlenstoff-verzweigten Thioestern **61**, **63** keine Acylierung beobachtet. Aus den initialen Acylierungsraten geht hervor, dass das (S)-konfigurierte Hydroxysubstrat **57b** 1.5-fach schneller acyliert als das (R)-konfigurierte Analogon **57a**. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit der vorhergesagten Konfiguration der Hydroxygruppe im natürlichen Intermediat der KS-Domäne.

Die Studie der Bacillaen KS 5 zeigte, dass diese Domäne eine hohe Substratspezifität aufweist. Ähnlich zu der Psymberin KS 3 wurde keine Acylierung der Bacillaen KS 5 bei den β -Kohlenstoff-verzweigten Thioestern **61**, **63** detektiert. In der putativen Biosynthese prozessiert die KS 5 ein *E*-2-Butenoyl-Substrat; dies spiegelte sich auch in dieser Studie wieder. Das α,β -ungesättigte Substrat **60** acylierte im Vergleich zu den anderen getesteten Substraten **57a**, **57b**, **58**, **59** und **61-63** am schnellsten das Protein. In vergleichbaren Raten zu Thioester **60** wurden auch das Acylsubstrat **58** und das gesättigte Substrat **59** akzeptiert. Der geringe sterische Anspruch ist hier wahrscheinlich wiederum der Grund für die Substrat-Akzeptanz der KS.

Fazit: Das Proof-of-Principle bestätigte die Präsenz einer Substratspezifität in trans-AT-Ketosynthasen. Die Studie zeigte darüber hinaus, dass die eigens entwickelte Methode geeignet ist, um verlässliche Aussagen über die Substratspezifität von trans-AT zu erhalten. Die Ergebnisse belegen, dass die Spezifität in verschiedenen KS-Domänen unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Während die KS 1 und KS 2 der Psymberin-PKS eine niedrige Spezifität bezüglich α,β -modifizierter Intermediate aufweist, zeigten die KS 3 des Psymberin-Clusters und die KS 5 der Bacillaen-PKS ausgeprägte Präferenzen bezüglich der getesteten Thioester. Analoga mit Kohlenstoffverzweigungen in der β -Position wurden von diesen Domänen nicht toleriert.

3.1.2 Analyse der Bacillaen KS 1 Substratspezifität

Die erste KS (KS 1) in der Bacillaen-PKS prozessiert das Intermediat eines NRPS-Moduls, das mit Glycin eine Aminosäure in die wachsende Polyketidkette einbaut (Abbildung 54). Im Rahmen dieser Studie wurde die Toleranz der KS 1 bezüglich verschiedener Aminosäuren, sowie der Einfluss der verschiedenen funktionellen Gruppen im natürlichen Substrat auf die Spezifität untersucht. Für die Analyse der KS 1 wurden die Substrate **64a-c**, **65-71** synthetisiert. Annette Kampa aus der AG Piel exprimierte im Rahmen ihrer Doktorarbeit die KS-Domäne. Die Proteinassays wurden in Kooperation mit der Universität Nottingham (M. Jenner und N. Oldham) durchgeführt.

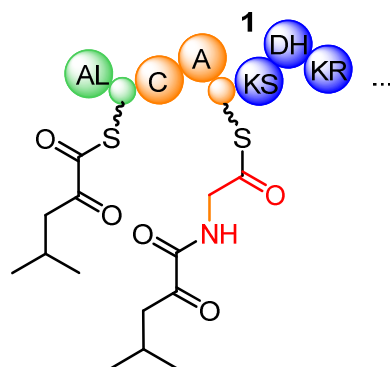


Abbildung 54: Ausschnitt aus der Bacillaen-PKS. KS 1 prozessiert das Intermediat eines NRPS-Moduls (orange), das Glycin (rot) inkorporiert.

3.1.2.1 Synthese der SNAC-Substrate

Über die etablierte Methode der Peptidsynthese mittels EDC-HCl und HOBt wurden, ausgehend von der α -Ketosäure **121** und den benzylgeschützten Aminosäuren **122a-c**, die Amide **123a-c** in moderaten (**123b**: 53%, **123c**: 58%) bis guten (**123a**: 78%) Ausbeuten synthetisiert (Abbildung 55).⁹⁶ Durch die mit Palladium katalysierte Hydrierung der Benzylester **123a-c** wurden die Säuren **124a-c** dargestellt.⁹⁷ Dabei wurde das Glycinderivat **124a** mit 90% Ausbeute in vergleichbarer Ausbeute zur Literatur synthetisiert. Sowohl die Ausbeute des Alaninderivats **124b** (78%), als auch des Valinderivats **124c** (57%) waren deutlich niedriger als für Hydrierungen üblich. Da in den NMR-Spektren der Rohprodukte keine Eduktsignale zu sehen waren, ist zu vermuten, dass bei der Aufarbeitung Produkt verloren wurde. Die mit Carbonyldiimidazol (CDI) initiierte Reaktion zwischen den Säuren **124a-c** mit *N*-Acetylcysteamin (**120**) ergab die SNAC-Thioester **64a-c** in literaturüblichen Ausbeuten (**64a**: 60%, **64b**: 62%, **64c**: 49%).⁹⁸

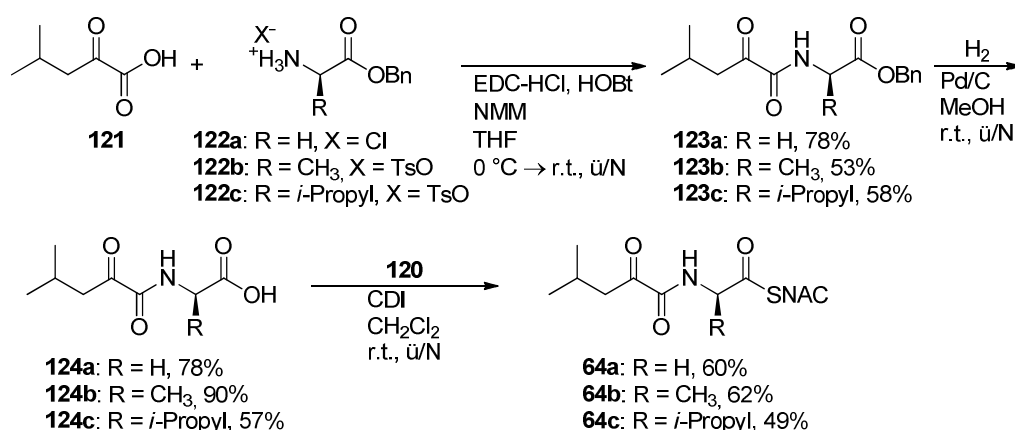


Abbildung 55: Synthese der SNAC-Substrate **64a-c**; TsO: Tosylat, EDC-HCl: 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid, HOBt: 1-Hydroxybenzotriazol, NMM: *N*-Methylmorpholin, THF: Tetrahydrofuran, MeOH: Methanol, CDI: Carbonyldiimidazol.

Zunächst wurde versucht den Thioester **65** durch die Kupplung zwischen dem Thiol **120** und Glycin **125a** zu synthetisieren (Abbildung 56). *N*-Ethylglycin (**125a**) ist jedoch unlöslich in den organischen Lösemitteln Tetrahydrofuran (THF), *N,N*-Dimethylformamid (DMF) und Dichlormethan, die bei der Peptidsynthese Verwendung finden. Durch die Schützung der Aminogruppe des Glycins **125a** als Boc-Amin **125b** wurde die Löslichkeit in organischen Lösemitteln verbessert.⁹⁹ Die Reaktion der Säure **125b** mit Cysteamin **120** ergab den Thioester **126** mit 85% in guter Ausbeute. Anschließend wurde durch die saure Boc-Entschützung der SNAC-Thioester **65** in quantitativer Ausbeute dargestellt.¹⁰⁰

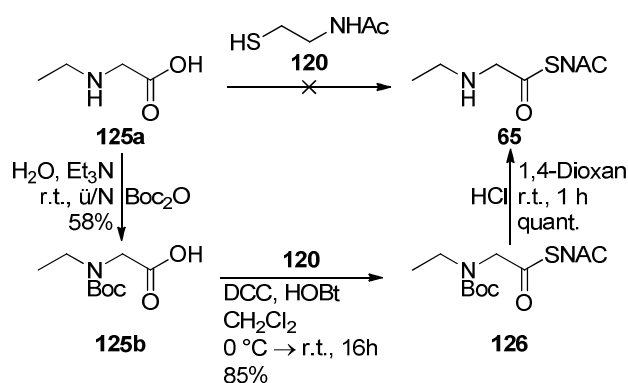


Abbildung 56: Synthese des Thioesters **65**; Et₃N: Triethylamin, Boc₂O: Di-*tert*-Butyldicarbonat.

Ausgehend von *L*-Leucin (**127**) wurde zunächst über eine Diazotierung die Aminosäure **127** in die α -Hydroxysäure **80a** mit 68% Ausbeute überführt (Abbildung 57).¹⁰¹ Diese Methode bietet einen kostengünstigen Zugang zur α -Hydroxysäure **80a** und kann im Multigramm-Ansatz durchgeführt werden. Anschließend wurde die Hydroxygruppe in quantitativer Ausbeute als Acetat **80b** geschützt.¹⁰² Die mit EDC-HCl und HOBt aktivierte Peptidkupplung mit dem geschützten Glycin **122a** ergab den Benzylester **128a** mit 80% in üblicher Ausbeute für Peptidknüpfungen. Anschließend wurde zunächst baseninduziert die α -Hydroxygruppe in quantitativer Ausbeute entschützt und der Benzylester **128b** wurde Palladium-katalysiert quantitativ zur Säure **129** hydriert.^{97,103} Die durch EDC-HCl vermittelte Reaktion der Säure **129** mit *N*-Acetylcysteamin (**120**) ergab den Thioester **69** in 41% Ausbeute.

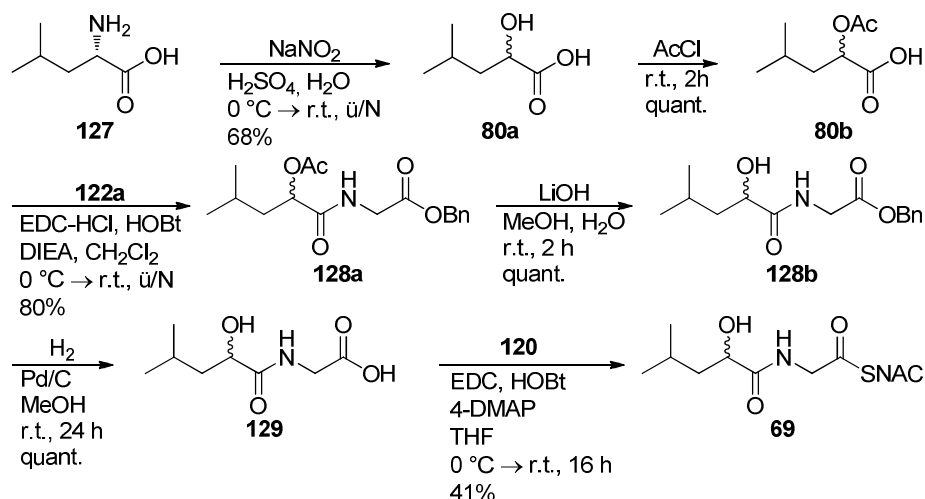


Abbildung 57: Synthese des SNAC-Thioesters **69**; AcCl: Acetylchlorid, DIEA: Diisopropylethylamin.

Die Thioester **66-68**, **70**, **71** wurden ausgehend von den kommerziell erhältlichen Säuren **130a-e** synthetisiert (Abbildung 58). Für die SNAC-Kupplung wurde entweder die Kombination aus EDC und HOBT (Methode A) oder CDI (Methode B) als Kupplungsreagenz verwendet.^{98,104} Alle Thioester **66-68**, **70**, **71** wurden in guten (**66**: 73%, **68**: 71%, **70**: 72%) bis sehr guten Ausbeuten (**67**: 98%, **71**: 97%) dargestellt. Sowohl für den Oxazolthioester **70**, als auch für den Thiazolthioester **71** wurden die Literaturausbeuten reproduziert.¹⁰⁵

| $\text{R}-\text{C}(=\text{O})\text{OH} \xrightarrow[\text{A oder B}]{\text{120}} \text{R}-\text{C}(=\text{O})\text{SNAC}$ Säure Thioester | | A: EDC-HCl, HOBT 4-DMAP, CH_2Cl_2 $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{r.t.}$, ü/N B: CDI, CH_2Cl_2 r.t., ü/N | |
|---|---------|--|----------|
| Säure | Methode | Thioester | Ausbeute |
| 130a: R= | A | 66: R= | 73% |
| 130b: R= | B | 67: R= | 98% |
| 130c: R= | A | 68: R= | 71% |
| 130d: R= | A | 70: R= | 72% |
| 130e: R= | A | 71: R= | 97% |

Abbildung 58: Synthese der Thioester **66-68**, **70**, **71** ausgehend von den Säuren **130a-e** mittels etablierten Methoden der Peptidsynthese (A oder B).

3.1.2.2 Untersuchung der Substratspezifität

Die Inkubation der KS 1 mit den Substraten **64a-c** zeigte, dass Thioester **64a**, der das natürliche Intermediat imitiert, das beste Substrat im Vergleich zu den Derivaten **64b,c** darstellt (Abbildung 59, Tabelle 2).¹⁰⁶ Das Alanin-Substrat **64b** wurde ebenfalls von der KS Domäne akzeptiert, jedoch mit einer signifikant langsameren Acylierungsrate als der SNAC-Thioester **64a**. Bei der Inkubation mit dem Valinthioester **64c** wurde keine Acylierung beobachtet. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass die KS-Domäne spezifisch gegenüber Substituenten in der α -Position reagiert. Sterisch anspruchsvolle Substituenten werden von der KS 1 nicht akzeptiert.

Um den Einfluss der verschiedenen funktionellen Gruppen des natürlichen Intermediats zu analysieren, wurden die SNAC-Substrate **65-68** mit der KS 1 getestet (Abbildung 59, Tabelle 2). Mit den Substraten **65**, **66** wurden die beiden Funktionalitäten der Amidbindung untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die KS 1 das Amino-SNAC **65** akzeptiert, das Carbonylderivat **66** hingegen nicht. Daraus lässt sich schließen, dass innerhalb der Amid-Bindung das Stickstoffatom wichtig für eine erfolgreiche Acylierung der KS 1-Domäne ist. Hingegen hat die Carbonylfunktion keinen Einfluss auf die Substratspezifität.

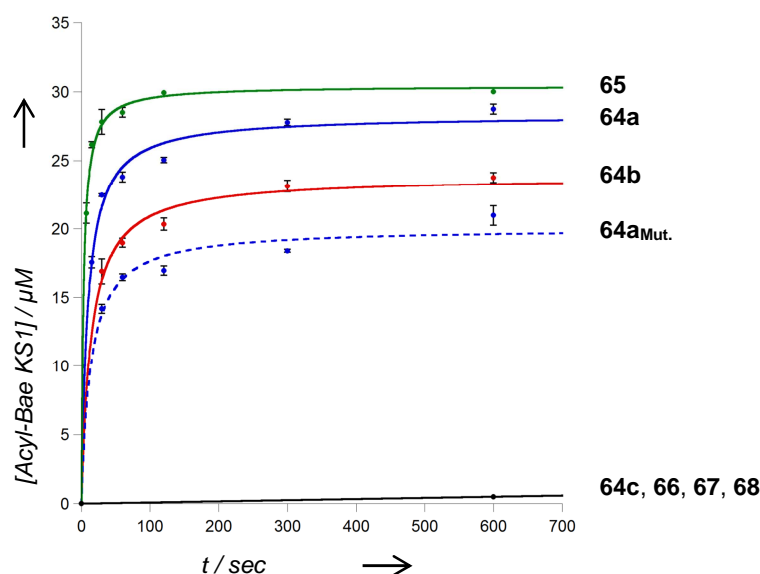


Abbildung 59: Zeitaufgelöste Acylierung der Bacillaen KS1 mit den Substraten **64a-c**, **65-68**, sowie der Inkubation der N206A-Mutante mit dem SNAC-Thioester **64a** (gestrichelte Linie, **64a_{Mut.}**).

Mit Substrat **67** wurde der Einfluss der Ketogruppe im natürlichen Substrat **64a** untersucht. Die Auswirkung der Verschiebung der Amidfunktion in γ -Position wurde mit Substrat **68** analysiert, da die nachfolgende KS Domäne in der PKS ein γ -Aminosubstrat

prozessiert (vgl. Abbildung 23). Bei beiden Substraten **67**, **68** wurde keine Acylierung beobachtet. Die Ergebnisse demonstrierten, dass weitreichende Interaktionen zwischen der Carbonylfunktion und dem Protein die Substratspezifität der KS Domäne nicht beeinflussen. Zudem zeigten die Daten, dass das prozessierte Amid aus einer α -Aminosäure hervorgehen muss.

In vorangegangenen Studien wurde postuliert, dass die Reduktion der Ketogruppe zum Hydroxyderivat nach der Kettenverlängerung der KS 1 durch eine KR in Modul 3 katalysiert wird (vgl. Abbildung 23).⁶⁴ Mit Substrat **69** wurde diese Hypothese untersucht. Der Vergleich der initialen Acylierungsraten vom δ -Ketothioester **64a** und dem Hydroxy-analogon **69** zeigte, dass Substrat **69** tatsächlich etwa 20% langsamer prozessiert wurde als das für die Biosynthese vorhergesagte Intermediat **64a** (Tabelle 2). Jedoch stellten die Daten keinen eindeutigen Beweis des Oxidationsgrades dar.

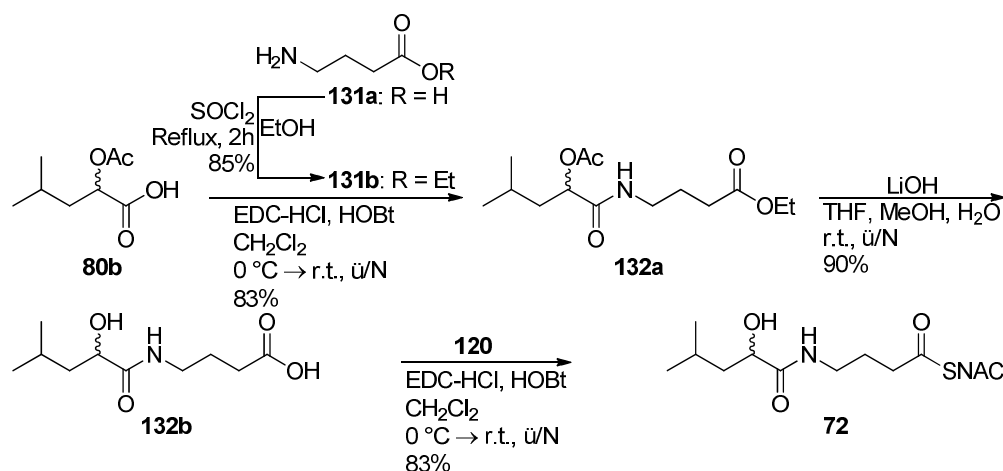
Aus NRPS-Modulen können in Anwesenheit von Cy- und Ox-Domänen Heteroaromaten hervorgehen (s. Seite 14). Mit den SNAC-Thioestern **70**, **71** wurde analysiert, ob die KS 1 von solchen zyklischen Substraten acyliert wird. Die Acylierungsraten beider Heterozyklen ist im Vergleich zum natürlichen Substrat **64a** um eine Zehnerpotenz niedriger (Tabelle 2). Wahrscheinlich ist die Flexibilität der Heteroaromaten-Ringe zu gering und die daraus resultierende sterische Repulsion mindert die Acylierung der KS 1-Domäne.

Tabelle 2: Initiale Acylierungsraten der Bacillaen KS 1 mit den SNAC-Thioestern **64a-c**, **65-71**; *N.D.*: keine detektierbare Acylierung während der Inkubation; SNAC-Thioester, der das natürliche Substrat imitiert, geschätzter Fehler: $\pm 0.005 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$.

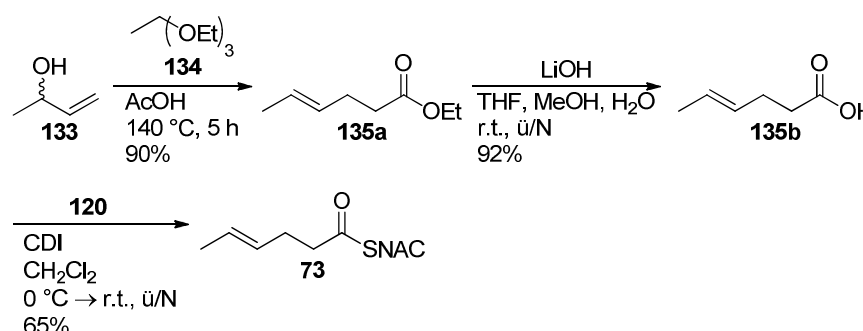
| Substrat | Initiale Acylierungsrate | |
|------------|--|---------------|
| | [$10^{-6} \text{ mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$] | |
| | Wildtyp | N206A-Mutante |
| 64a | 0.73* | 0.26 |
| 64b | 0.31 | 0.14 |
| 64c | <i>N.D.</i> | <i>N.D.</i> |
| 65 | 0.90 | 0.39 |
| 66 | <i>N.D.</i> | <i>N.D.</i> |
| 67 | <i>N.D.</i> | <i>N.D.</i> |
| 68 | <i>N.D.</i> | <i>N.D.</i> |
| 69 | 0.60 | 0.14 |
| 70 | 0.06 | 0.06 |
| 71 | 0.06 | 0.04 |

In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass die Aminosäure (X-Cys), die direkt vor dem aktivierten Cystein (Cys) im Protein lokalisiert ist, die Substratspezifität der *trans*-AT-KS entscheidend beeinflusst.⁹⁴ Eine Analyse aller 17 bekannten Aminosäure-prozessierenden *trans*-AT-KS zeigte, dass in elf Fällen Asparagin (Asn) die X-Cys-Position einnimmt. Bisher wurde in keiner anderen sequenzierten KS Domäne aus *cis*- oder *trans*-AT-PKS X = Asn gefunden. Somit ist zu vermuten, dass Asparagin durch Interaktionen mit dem prozessierten 2-Amidoacetylsubstrat die Acylierung unterstützt. Um diese Hypothese zu untersuchen wurde von Matthew Jenner (Universität Nottingham) eine Mutante (N206A) erzeugt, in der Asn durch Alanin ersetzt wurde. Die Inkubation der N206A-Mutante mit den SNAC-Thioestern **64a**, **b**, **65** und **69** zeigte, dass die Acylierungsraten im Vergleich zum Wildtyp signifikant niedriger sind (Abbildung 59, Tabelle 2). Somit wurde nachgewiesen, dass die X-Position erheblichen Einfluss auf die Spezifität der Aminosäure-prozessierenden KS hat. Jedoch zeigten die phylogenetischen Analysen ebenso, dass andere Aminosäure-prozessierende KS mit X= Ala existieren, sodass der Asn-Rest nicht determinierend für die Substratspezifität ist.

*Fazit: Mit den Substraten **64a-c**, **71**, **72** wurde gezeigt, dass die Bacillaen KS 1 wenig tolerant gegenüber Veränderungen in der α -Position ist. Substrate mit sterisch anspruchsvollen Substituenten oder reduzierter Flexibilität in dieser Position werden nicht akzeptiert. Durch den Vergleich der Acylierungsraten von Substrat **64a** und **69** wurde versucht, neue Erkenntnisse über den Reduktionsgrad der δ -Position zu erhalten. Allerdings wurden beide Substrate in nahezu identischen Raten akzeptiert, sodass keine verlässlichen Aussagen bezüglich der δ -Funktionalität im natürlichen Substrat möglich waren. Mit den Substraten **65-68** wurde der Einfluss der verschiedenen Funktionalitäten des putativen natürlichen Intermediats auf die Spezifität untersucht. Es wurde gezeigt, dass die NH-Gruppe der Amidfunktionalität essentiell für die Substratspezifität der KS 1 ist. Phylogenetische Analysen von Aminosäure-prozessierenden KS führten zur Annahme, dass das neben dem aktivierten Cystein lokalisierte Asparagin mit der NH-Gruppe des Substrats interagiert und somit die Acylierung der KS 1 vom Substrat beeinflusst. Die Hypothese wurde durch die Analyse einer Mutante, bei der Asparagin durch Alanin ersetzt wurde, untermauert. Das natürliche Substrat **64a** acylierte die Mutante um etwa 70% langsamer als die natürliche KS-Domäne.*


 Abbildung 61: Synthese des SNAC-Thioesters **72**.

Durch eine Johnson-Orthoester-Umlagerung wurde der Alkohol **133** in den Ester **135a** überführt (Abbildung 62).^{108,109} Die Literaturausbeute von 90% wurde dabei reproduziert. Der Ester **135a** wurde anschließend unter basischen Bedingungen zur Säure **135b** in 92% Ausbeute entschützt, die anschließend mit CDI katalysiert in 65% in die Zielverbindungen **73** überführt wurde.^{98,107}


 Abbildung 62: Synthese des Thioesters **73**.

Die Johnson-Orthoester-Umlagerung ist eine Variation der Claisen-Umlagerung, mit der in einem Syntheseschritt aus preiswerten Edukten direkt die geforderte C₆-Kettenlänge aufgebaut und die *trans*-konfigurierte Doppelbindung in der γ,δ -Position installiert wurde.¹⁰⁹ Unter saurer Katalyse wird zunächst der Triethylorthoester (**134**) durch die Reaktion mit dem Allylalkohol **133** in den gemischten Orthoester **139** überführt (Abbildung 63). Unter baseninduzierter Abspaltung von Ethanol wird der Orthoester zum Allyl-Vinylether **140** eliminiert. Durch die mit Wärme initiierte [3,3]-sigmatrope Umlagerung des Intermediats **140** wird der Ester **135a** gebildet. Dabei wird das Gleichgewicht zugunsten des Esters **135a** verschoben, indem das während der Reaktion entstehende Ethanol kontinuierlich destillativ entfernt wird.

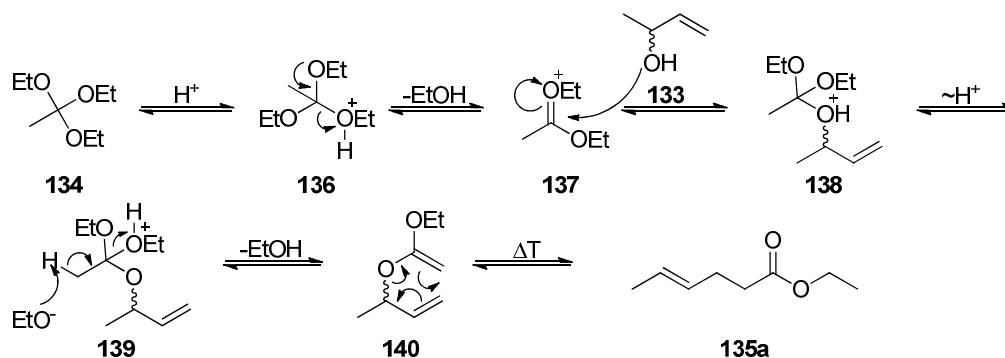


Abbildung 63: Mechanismus der Johnson-Orthoester-Umlagerung zur Synthese des Esters **135a**.

Durch die Oxidation des kommerziell erhältlichen Alkohols **141** mit Pyridiniumdichromat (PDC) wurde der Aldehyd **142** in 90% Ausbeute dargestellt (Abbildung 64).^{110,111} Trotz der hohen Toxizität des PDC wurde es aufgrund der einfachen Reaktionsbedingungen, der schnellen Aufarbeitung und der Anwendbarkeit im Multigrammansatz verwendet. Anschließend wurde durch eine Wittig-Reaktion mit dem Ylid **143a** der Aldehyd **142** in den α,β -ungesättigten Ester **144** überführt, der anschließend Palladium-katalysiert zum gesättigten Ester **145a** hydriert wurde.^{97,112} Die Stereoselektivität bezüglich der Doppelbindungskonfiguration kann prinzipiell durch die Reaktionsbedingungen und das verwendete Ylid gesteuert werden. Jedoch geht durch die anschließende Hydrierung der Doppelbindung die Stereoinformation im Molekül verloren, sodass die Stereoselektivität der Wittig-Reaktion vernachlässigt wurde. Die basenkatalysierte Entschützung ergab die Säure **145b** mit 98% in sehr guter Ausbeute.¹⁰⁷ Der Thioester **74** wurde durch die mit CDI induzierte Reaktion der Säure **145b** mit *N*-Acetylcysteamin (**120**) in 69% Ausbeute dargestellt.⁹⁸

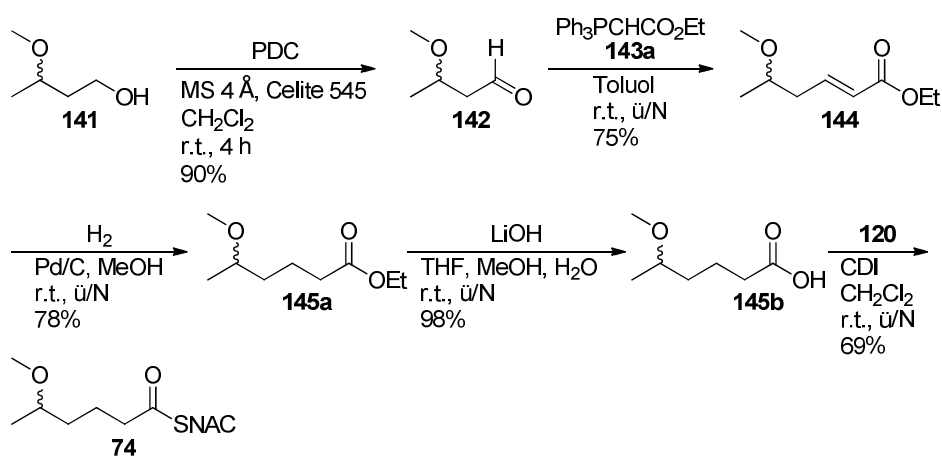


Abbildung 64: Synthese des δ -Methoxythioesters **74**; PDC: Pyridiniumdichromat.

Die kommerziell verfügbare (*R*)-3-Hydroxybuttersäure (**119a**) wurde zunächst analog der Literaturvorschrift mit 75% Ausbeute in den Methoxymethylester **146a** überführt.¹¹³ Das bei der Reaktion *in situ* generierte Dimethylolithium deprotoniert beide azide Gruppen der Hydroxysäure **119a**, ohne dabei das Stereozentrum zu racemisieren. Weiterhin zeichnet sich diese Synthese durch sehr gute Ausbeuten aus. Die mit LiOH katalysierte Entschützung ergab die Säure **146b** mit 65% in moderaten Ausbeuten. Die Polarität der kurzkettigen Säure **146b** und der daraus resultierenden Hydrophilie führte wahrscheinlich bei der wässrigen Aufarbeitung dazu, dass ein Teil des Substrats **146b** in der wässrigen Phase verblieb. Im letzten Schritt wurde die Säure **146b** durch die CDI katalysierte Reaktion mit dem Thiol **120** in den Thioester **75** mit 57% Ausbeute überführt.

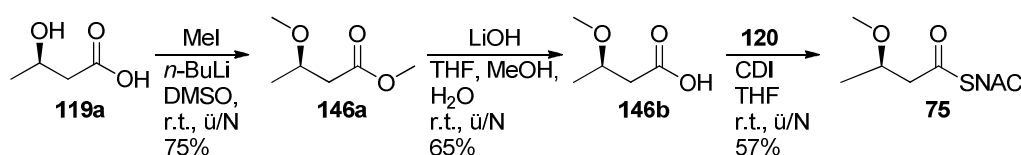


Abbildung 65: Synthese des β -Methoxysubstrats **75**; *n*-BuLi: *n*-Butyllithium, DMSO: Dimethylsulfoxid.

3.1.3.2 Untersuchung der Bacillaen KS 2

Bei der Inkubation der Bacillaen KS 2 mit dem natürlichen Substrat **72** wurde keine Acylierung beobachtet (Tabelle 3). Interessanterweise wurde das verkürzte Analogon **68** von der KS 2 akzeptiert (Abbildung 66, Tabelle 3). Die NMR-Spektren des Thioesters **72** zeigten keine nennenswerten Verunreinigungen, sodass andere Effekte die Acylierung beeinflussen müssen (siehe Anhang Abbildung 148, Abbildung 149). Denkbar wäre aus chemischer Sicht eine Dimerisierung des Substrats **72** über Wasserstoffbrückenbindungen der Hydroxygruppe mit einer Carbonylfunktion, sodass der Thioester **72** nicht mehr in die Bindungstasche passt. Einen ähnlichen Effekt könnten komplexierte Ionen am Substrat **72** verursachen. Beweise wurden hierfür aber nicht gefunden. Das Substrat **72** wurde als Racemat synthetisiert. Aus biologischer Sicht könnten die Enantiomere konkurrieren, sodass das Enzym kompetitiv gehemmt wird.

Die Ergebnisse der Inkubation mit dem δ -Ketosubstrat **67**, dem γ,δ -ungesättigten Thioester **73** und dem δ -Methoxyderivat **74** zeigten, dass die Substratspezifität distal der β -Position signifikant abfällt (Abbildung 66, Tabelle 3). Alle in der γ,δ -Position modifizierten Substrate **67**, **73** und **74** wurden von dem Enzym akzeptiert. Jedoch ist anhand der initialen Acylierungsraten ersichtlich, dass weitreichende Wechselwirkungen die Spezifität der KS leicht beeinflussen. Das γ,δ -ungesättigte Substrat **73** acylierte im

Vergleich zu den in δ -Position verzweigten Thioestern **67** und **74** schneller die KS 2. Wahrscheinlich ist der Einfluss der reduzierten Flexibilität im ungesättigten Substrat **73** niedriger als der Einfluss der sterischen Hinderung durch die δ -Verzweigung in den Thioestern **67**, **74**. Der Vergleich der Acylierungsraten der Moleküle **67** und **74** zeigte, dass die planare Verzweigung im Ketothioester **67** einen geringeren Einfluss als die sp^3 -hybridisierte Verzweigung im Methoxysubstrat **74** hat.

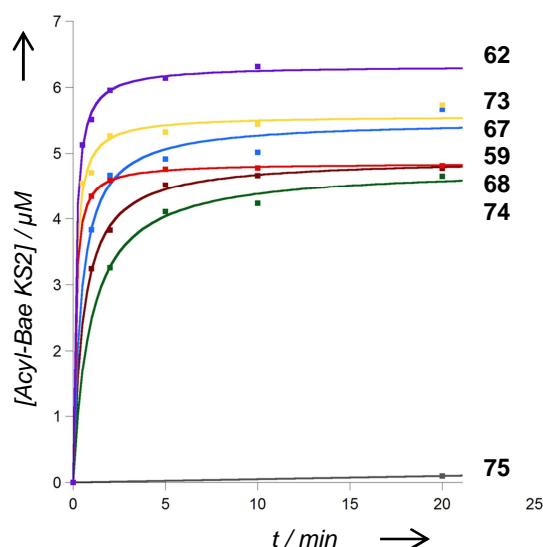


Abbildung 66: Zeitaufgelöste Acylierung der Bacillaen KS 2 mit den Substraten **59**, **62**, **67**, **68**, **73-75**.

Tabelle 3: Initiale Acylierungsraten der Bacillaen KS 2 mit den Substraten **59**, **62**, **67**, **68**, **72-75**; *N.D.*: keine detektierbare Acylierung während der Inkubation; * SNAC-Thioester, der das natürliche Substrat imitiert, geschätzter Fehler: $\pm 0.005 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$.

| Substrat | Initiale Acylierungsrate [$\text{mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$] |
|-----------|--|
| 59 | 0.3 |
| 62 | 0.7 |
| 67 | 0.3 |
| 68 | 0.2* |
| 72 | <i>N.D.</i> * |
| 73 | 0.5 |
| 74 | 0.1 |
| 75 | <i>N.D.</i> |

Durch Inkubation der KS 2 mit den kurzkettigen Substraten **59**, **62** und **75** wurde gezeigt, dass die KS 2 proximal zur γ -Position Substratspezifität aufweist. Sowohl das aliphatische Analogon **59**, als auch das β -Ketosubstrat **62** acylierten das Protein, das β -Methoxyderivat **75** hingegen nicht. Die sterische Hinderung in dem verzweigten

Substrat **75** ist zu groß, sodass es nicht in die Bindungstasche passt. Interessanterweise wird das β -Ketosubstrat **62** von dem Enzym akzeptiert. Dabei ist die initiale Acylierungsrate von **62** mehr als doppelt so groß als die des Butyrylthioesters **59**, der die Struktur des natürlichen Intermediats bis zur γ -Position imitiert. Der β -Ketothioester **62** kann durch Keto-Enol-Tautomerie sowohl als Wasserstoffbrückenbindungsdonor in der Enol-Form **147**, als auch als Akzeptor in der Keto-Form **62** fungieren (Abbildung 67). Anhand der Analyse der Bacillaen KS 1 wurde nachgewiesen, dass Interaktionen zwischen Aminosäuren in direkter Nachbarschaft des aktivierten Cysteins und des β -Stickstoffatoms im Substrat **64a** die Acylierung unterstützen (s. Kapitel 3.1.2). Ähnliche Wechselwirkungen könnten auch die Acylierung des Substrats **62** beeinflussen.

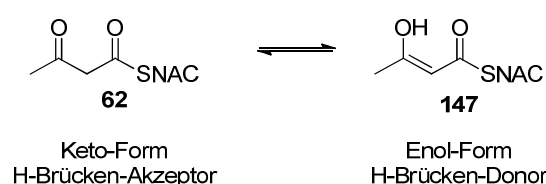


Abbildung 67: Keto-Enol-Tautomerie des β -Ketothioesters **62**.

*Fazit: Die Untersuchung der Bacillaen KS 2 ergab, dass die Substratspezifität distal der β -Position signifikant relaxiert. Alle in der γ,δ -Position derivatisierten Substrate **67**, **68**, **73**, **74** acylierten das Protein. Jedoch deuteten die initialen Acylierungsraten der Substrate **67**, **68**, **73**, **74** darauf hin, dass weitreichende Substrat-Protein-Wechselwirkungen vorhanden sind, die die Spezifität des Enzyms beeinflussen. Mit den Substraten **59**, **62**, **75** wurde bestätigt, dass die Spezifität der untersuchten KS 2 bis zur β -Position stark ausgeprägt ist.*

3.1.4 Synthese von Substraten für die Untersuchung der Bacillaen KS 4 Substratspezifität

Die Bacillaen KS 4 prozessiert ein *cis*-konfiguriertes α,β -ungesättigtes Substrat, für das der Thioester **76** als Standard synthetisiert wurde (Abbildung 68). Das *trans*-konfigurierte Substrat **77** wurde hergestellt, um den Einfluss der Doppelbindungskonfiguration auf die Substrattoleranz der KS 4 zu untersuchen. Mit dem γ -Methylthioester **78** und dem δ -Methoxysubstrat **79** sollte der Einfluss der γ - und δ -Position auf die Spezifität analysiert werden. Da die Untersuchungen nur einen tendenziellen Einblick liefern sollten, wurde auf eine enantioselektive Synthese verzichtet. Bislang konnte die KS-Domäne nicht exprimiert werden. Deshalb werden im folgenden Abschnitt nur die Ergebnisse der Synthesen diskutiert.

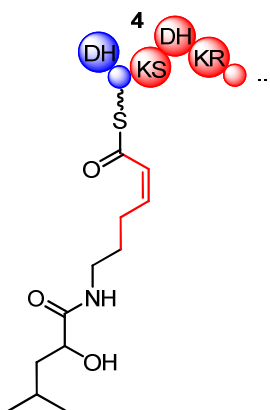


Abbildung 68: Ausschnitt aus der Bacillaen-PKS: KS 4 prozessiert ein *cis*-konfiguriertes α,β -ungesättigtes Substrat; Rot: Bereich der auf Substratspezifität untersucht werden sollte.

4-Aminobutanol (**148**) wurde zunächst basenkatalysiert in den geschützten Alkohol **81** in 83% Ausbeute überführt, der anschließend mit der geschützten Säure **80b** zum Amid **82a** gekuppelt wurde (Abbildung 69).⁶⁴ Die mit EDC-HCl initiierte Reaktion gelang dabei mit 83% in üblichen Ausbeuten für Peptidkupplungen. Durch die selektive Entschützung der primären Hydroxyfunktion mit Flusssäure wurde der Alkohol **82b** in 73% dargestellt.¹¹⁰ Anschließend wurde versucht, den Alkohol **80b** mit PDC zum Aldehyd **83** zu oxidieren. Jedoch konnte der Aldehyd **83** nicht isoliert und charakterisiert werden, sodass dieser ohne weitere Aufreinigung in der Still-Gennari-Reaktion zum *cis*-konfigurierten α,β -ungesättigten Ester **84a** in 30% Ausbeute umgesetzt wurde.¹¹⁴ Anschließend wurden baseninduziert beide Schutzgruppen abgespalten und die Säure **84b** mit 81% in guten Ausbeuten erhalten.¹⁰⁷ Im letzten Schritt wurde die Säure **84b** durch die Reaktion mit dem Thiol **120** zum SNAC-Thioester **76** derivatisiert. Die durch EDC-HCl aktivierte Reaktion ergab mit 40% Ausbeute den Thioester **76** in üblicher Ausbeute für hydroxysubstituierte Substrate.^{104,115}

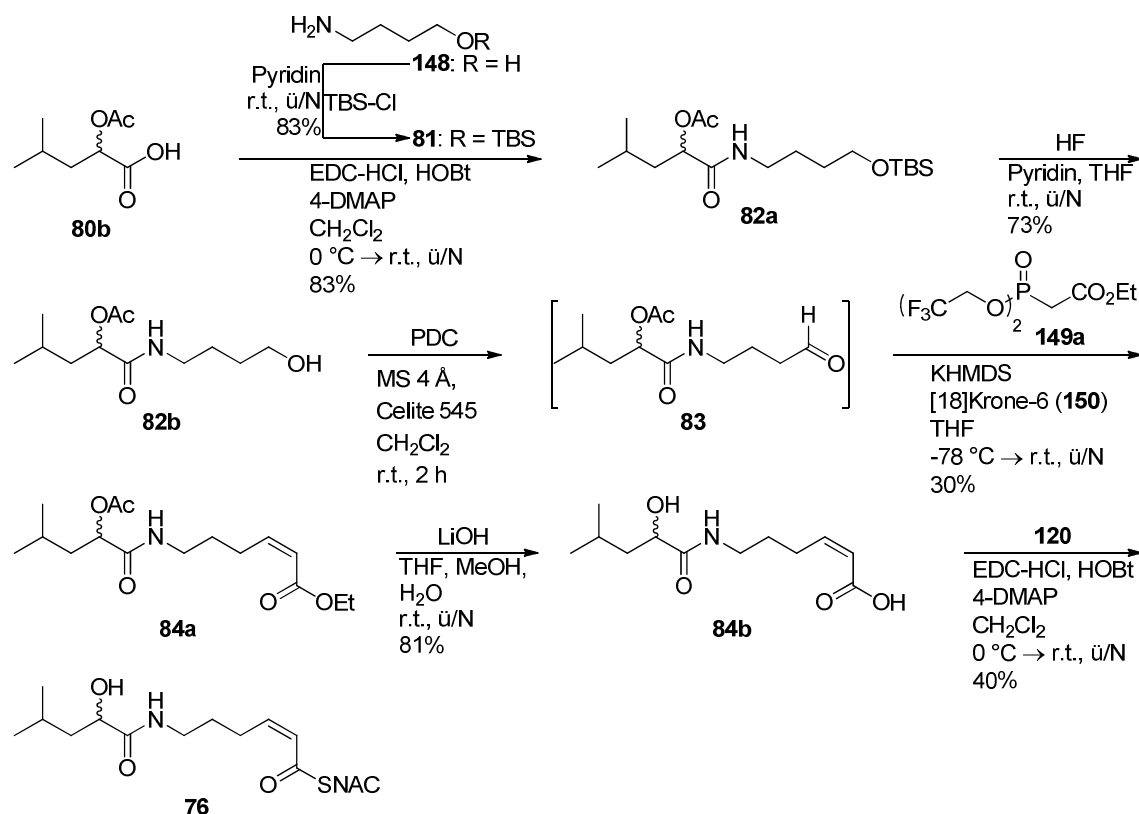


Abbildung 69: Synthese des SNAC-Thioesters **76**; TBS-Cl: *tert*-Butyldimethylsilylchlorid, MS 4 Å: Molekular-sieb 4 Å, KHMDS: Kaliumhexamethyldisilazan.

Die bei der Synthese zum Substrat **76** verwendete Still-Gennari-Variante der Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion (HWE-Reaktion) bietet einen hochselektiven Zugang zu (*Z*)-konfigurierten Olefinen ausgehend vom entsprechenden Aldehyd.¹¹⁶ Dabei ist der Mechanismus der Olefinierung noch nicht vollständig geklärt. Gesichert ist die *in situ* Deprotonierung des Phosphorreagenzes **149a** zum Phosphocarbanion **151** (Abbildung 70 A).¹¹⁷ Die Verwendung von [18]Krone-6 (**150**) als Kalium-Chelator führt zu stark dissoziativen Bedingungen und katalysiert die Deprotonierung. Es wird vermutet, dass das gebildete Carbanion **151** nukleophil am Aldehyd **152** addiert (Abbildung 70 B). Bei diesem Geschwindigkeits-bestimmenden Schritt werden die beiden Diastereomeren **153a** und **153b** gebildet. Die Betrachtung des hypothetischen Übergangszustandes (ÜZ) zeigt, dass die Bildung von Diastereomer **153b** begünstigt ist, da sich der sterisch anspruchsvolle Phosphorrest äquatorial in der Sesselkonformation des ÜZ befindet.¹¹⁷ Bei der Sesselkonformation des ÜZ zum Diastereomer **153a** steht der Phosphorrest in axialer Position. Die resultierenden 1,3-diaxialen Wechselwirkungen hemmen die Ausbildung des Zwischenprodukts **153a**. Anschließend wird durch einen intramolekularen Angriff das Oxaphosphetan **154** gebildet, das selektiv zum (*Z*)-konfigurierten Olefin **155** eliminiert (Abbildung 70 C).

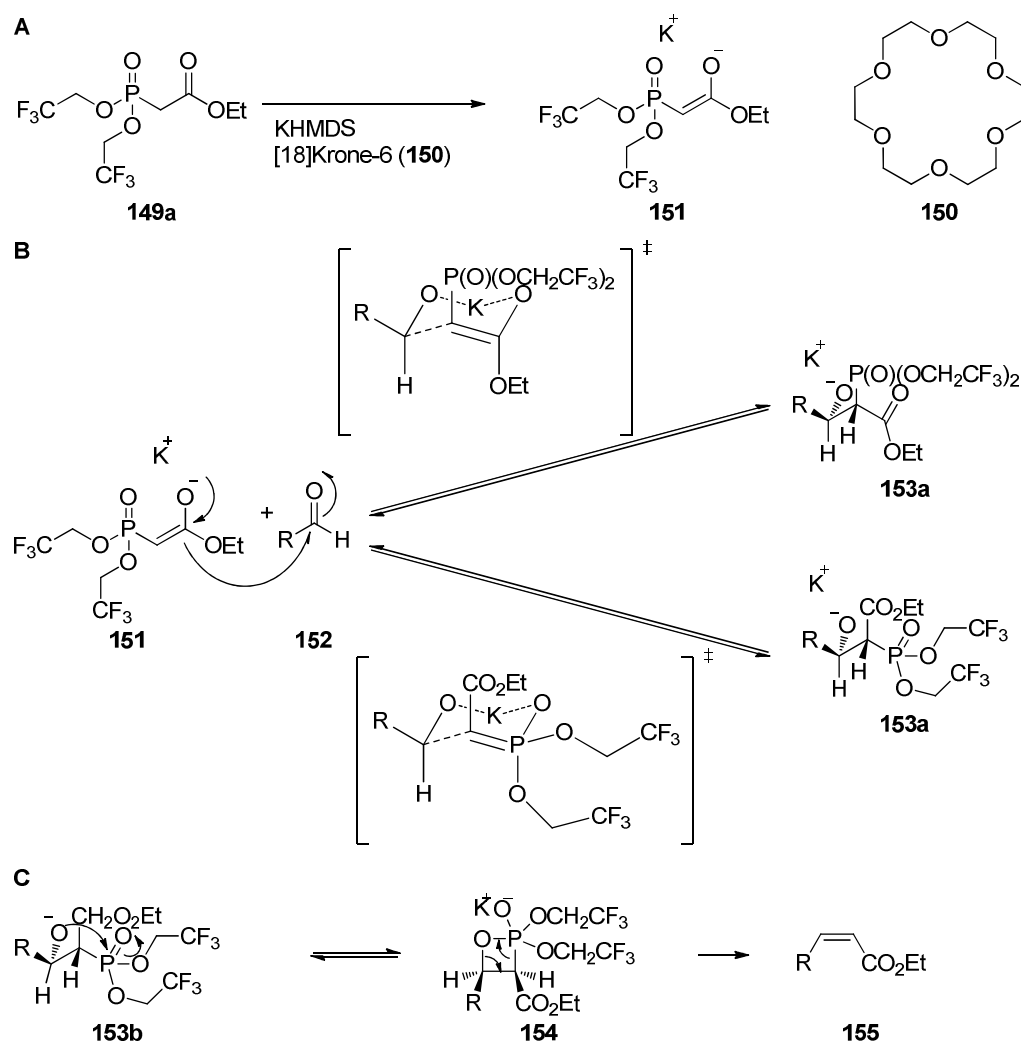


Abbildung 70: Still-Gennari-Olefinierung: **A)** *In situ* Erzeugung des Phosphonatcarbanions **151** unter stark dissoziativen Bedingungen; **B)** Geschwindigkeitsbestimmender Schritt: Nukleophiler Angriff des Carbanions **151** am Aldehyd **152** unter der Ausbildung der Diastereomeren **153a,b**; **C)** Ausbildung des Oxaphosphetan **154** und Eliminierung zum (*Z*)-konfigurierten Alken **155**.

Für die Synthese des Thioesters **77** wurde zunächst der Alkohol **82b** in einer Kombination aus Swern-Oxidation und Wittig-Olefinierung in den *trans*-konfigurierten, α,β -ungesättigten Ester **156a** mit 16% Ausbeute überführt (Abbildung 71).¹¹⁸ Anschließend wurde dieser zur Säure **156b** in 81% Ausbeute verseift.¹⁰⁷ Die Kupplung zwischen *N*-Acetylcysteamin (**120**) und der Säure **156b** ergab die Zielverbindung **77** mit 70% in guter Ausbeute.¹⁰⁴

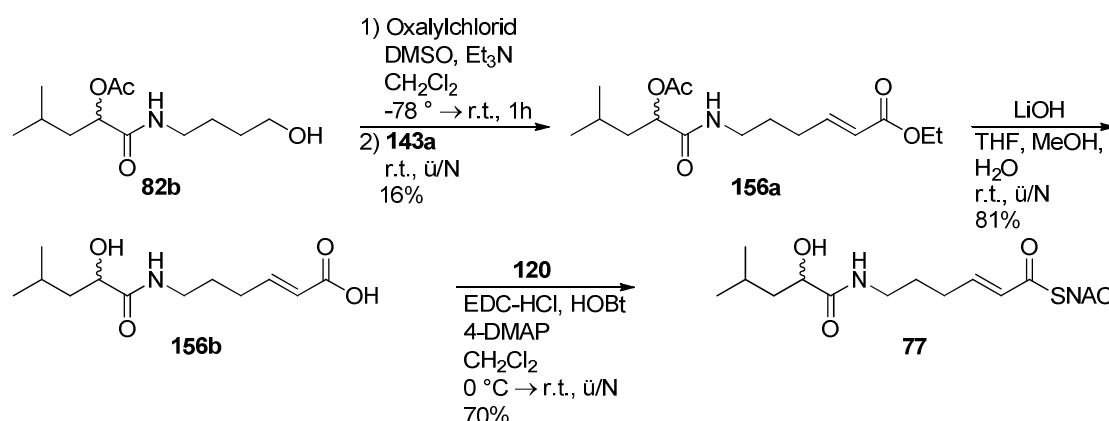


Abbildung 71: Synthese des SNAC-Thioesters **77**; Et₃N: Triethylamin.

In der Synthesesequenz des SNAC-Thioesters **77** wurde zur Darstellung der *trans*-konfigurierten Doppelbindung die Wittig-Reaktion verwendet. Im Gegensatz zu den Phosphonat-Carbanionen bei der Still-Gennari-Reaktion werden bei der Wittig-Reaktion Phosphorylide **157** verwendet.¹¹⁷ Diese reagieren in einer [2+2]-Cycloaddition mit einem Aldehyd **152** zu den beiden Diastereomeren **158a** und **158b**, die mittels ³¹P-NMR-Spektroskopie nachgewiesen wurden (Abbildung 72).¹¹⁹ Die Bildung des Diastereomers **158a** ist sterisch ungünstig und reversibel, sodass es, neben der Eliminierung zum *cis*-Olefin **159a**, zum *trans*-Produkt **158b** isomerisiert. Die Bildung der Zwischenstufe **158b** hingegen ist nicht reversibel und eliminiert exklusiv zum *trans*-Olefin **159b**. Die Stereoselektivität der Reaktion ist im Wesentlichen abhängig von der Stabilität des verwendeten Ylids **157**.¹²⁰ Ylide, die durch -M-Substituenten (z.B. R² = CO₂Et) stabilisiert sind, reagieren mit über 90% Stereoselektivität zum *trans*-Olefin. Dagegen führen nicht-stabilisierte Ylide überwiegend zum *cis*-Produkt.

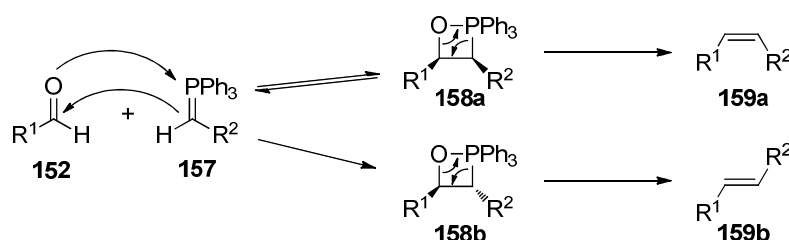


Abbildung 72: Mechanismus der Wittig-Reaktion: Eine [2+2]-Cycloaddition führt zu den Diastereomeren **158a**, **b**, die dann zu den jeweiligen Olefinen **159a** oder **159b** eliminieren.

Zunächst wurde das Aminobutanol **160a** quantitativ in den das TBS-geschützte Derivat **160b** überführt (Abbildung 73).¹²¹ Die anschließende Kupplungsreaktion zwischen der Säure **80b** und dem Amin **160b** ergab das Amid **161a** mit 81% in guten Ausbeuten.⁶⁵ Die selektive Entschützung der primären Hydroxygruppe mit Flusssäure

ergab den Alkohol **161b** mit 83% in vergleichbarer Ausbeute zur Literatur.¹¹⁰ Die Kombination aus Oxidation zum Aldehyd **162** und folgender Still-Gennari-Olefinierung ergab ein Gemisch aus den beiden Isomeren **163a** und **163b**, wobei das gewünschte *cis*-Olefin **163a** mit 5% nur in sehr geringer Ausbeute dargestellt wurde.¹¹⁴

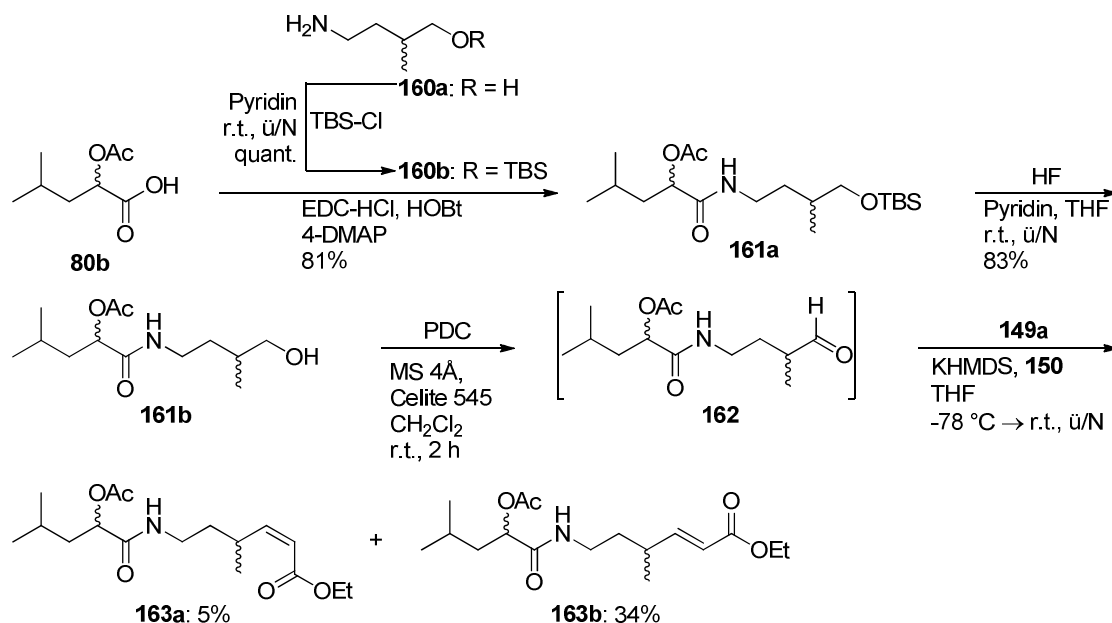


Abbildung 73: Synthese der Konfigurationsisomere **163a**, **b**.

Sowohl die Literaturausbeuten für die Still-Gennari-Olefinierung, als auch diejenigen für Wittig-Reaktionen liegen bei 80-90%.^{91,114,122} Die erzielten Ausbeuten bei der Synthese der *cis*-konfigurierten ungesättigten Ester **84a** und **163a** mit 30% bzw. 5% lagen deutlich niedriger im Vergleich zur Literatur (Abbildung 69, Abbildung 73). Ebenso wurde das *trans*-konfigurierte Substrat **156a** mit nur 16% Ausbeute in der Wittig-Reaktion dargestellt (Abbildung 71). Die schlechten Ausbeuten in diesen Reaktionen sind wahrscheinlich auf die Instabilität der Aldehyde **83** und **162** zurückzuführen. In der Literatur wurde gezeigt, dass ein *N*-geschütztes 4-Aminobutanalderivat **164** intramolekular zum Halbaminal **165** zyklisiert (Abbildung 74 A).¹²³ Bestätigt wurde die intramolekulare Ringschlussreaktion mittels Kernresonanzspektroskopie. Im ¹³C-NMR-Spektrum wurden, neben dem charakteristischen Signal des Aldehyds **164** bei $\delta \approx 200$ ppm, zwei weitere Signale bei $\delta \approx 80$ ppm detektiert. Diese wurden den C-1-Atomen der beiden Konfigurationsisomere des Halbaminals **165** zugeordnet. Bei der Analyse der ¹³C-NMR-Spektren des Aldehyds **85** wurden neben dem Carbonylsignal bei $\delta = 202.2$ ppm auch Signale bei $\delta = 81.1 - 82.4$ ppm gefunden, die die Zyklisierung des Aldehyds **83** zum Halbaminal bestätigen (Abbildung 74 B). Zum einen können die gebildeten Halbaminale keine Olefinierungsreaktion mit Yliden eingehen, zum anderen

sind diese OH-Azide und können durch Protonierung das Carbanion desaktivieren. Beide Effekte sind wahrscheinlich für die schlechten Ausbeuten in den Olefinierungsreaktionen verantwortlich.

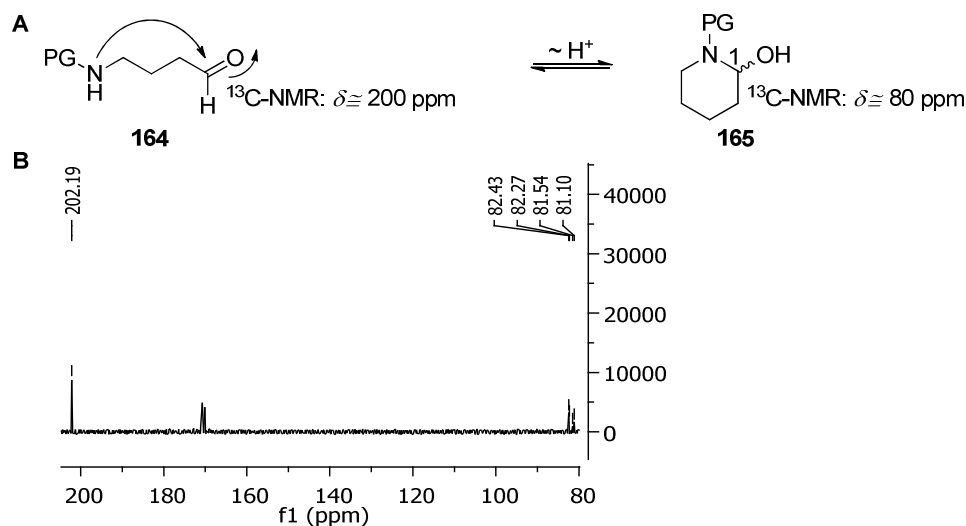


Abbildung 74: A) Intramolekulare Zyklisierung des Aldehyds **165** zum Halbamin **166** mit den ungefähren Verschiebungen der relevanten C-Atome im ^{13}C -NMR, B) Ausschnitt aus dem ^{13}C -NMR-Spektrum des Aldehyds **83**.

Aufgrund der Labilität des Aldehyds **162** wurde ein neuer Syntheseweg zur Darstellung des SNAC-Thioesters **78** etabliert (Abbildung 75). Ausgehend von 4-Aminobutanol (**160a**) wurde die Aminofunktion mit Boc_2O in quantitativer Ausbeute zum Boc-Amin **160c** geschützt.¹²⁴ Anschließend wurde über drei Stufen zunächst die Hydroxygruppe als TBS-Ether geschützt, dann baseninduziert eine zweite Boc-Gruppe an der Aminofunktion eingeführt und der TBS-Ether mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) gespalten. Das Di-Boc-Derivat **160d** wurde mit 58% in literaturüblicher Ausbeute erhalten.¹²⁵ Der Vorteil der doppelten Boc-Schätzung der Aminogruppe zeigte sich bei der Oxidation des Alkohols **160d** unter Swern-Bedingungen zum Aldehyd **166**.¹²⁵ Der Aldehyd **166** wurde mit 83% in guter Ausbeute isoliert und mittels NMR- und IR-Spektroskopie, sowie Massenspektrometrie vollständig charakterisiert. Die anschließende Still-Gennari-Olefinierung mit dem Phosphonat **149b** ergab den *cis*-konfigurierten, α,β -ungesättigten Methylester **167a** mit 83% in vergleichbarer Ausbeute zur Literatur.¹¹⁴ Unter sauren Bedingungen wurden beide Boc-Schutzgruppen in quantitativer Ausbeute entfernt.¹⁰⁰ Die Kupplungsreaktion zwischen dem Amin **167b** und der Säure **80b** ergab das Amid **168a** mit 51% in moderaten Ausbeuten. Der Ester **168a** wurde mit 84% Ausbeute zur Säure **168b** verseift.¹⁰⁷ Die abschließende Einführung der SNAC-Gruppe, initiiert mit EDC-HCl, ergab die Zielverbindung **78** in moderater 20% Ausbeute.

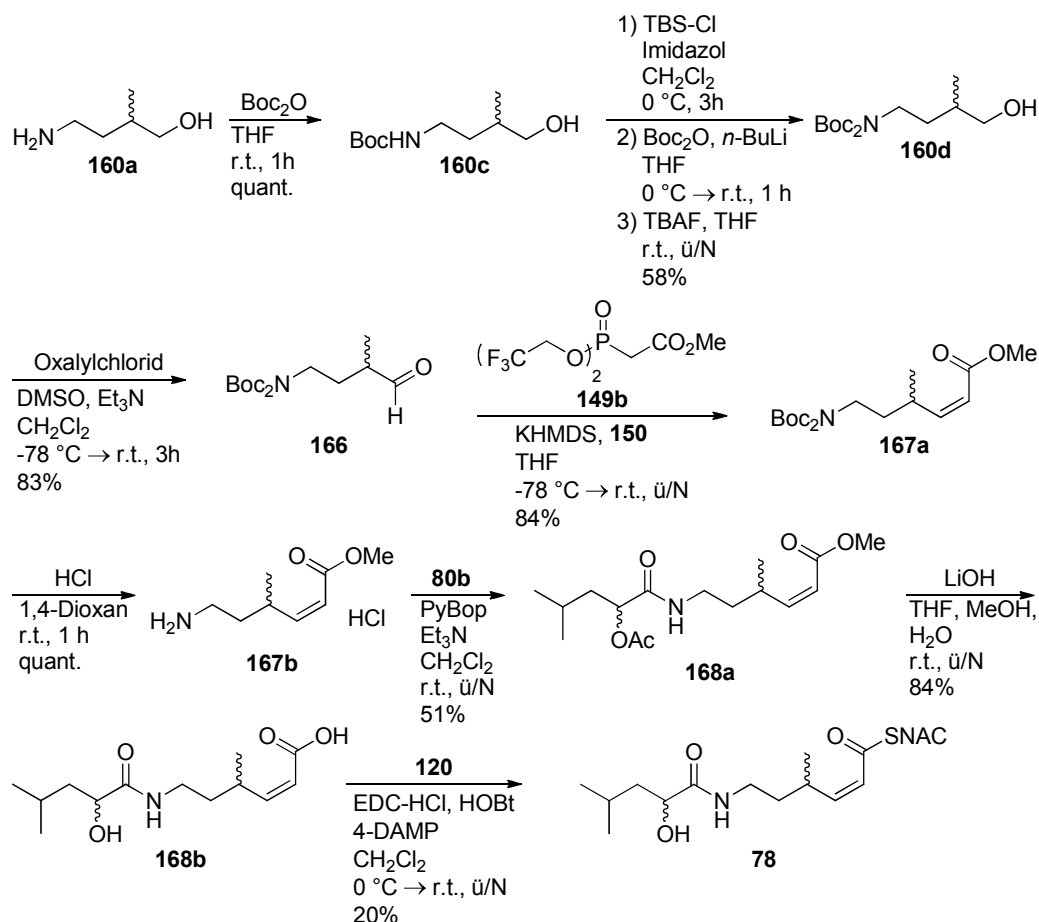


Abbildung 75: Synthese des γ -Methyl-substituierten SNAC-Thioesters **78**; TBAF: Tetrabutylammoniumfluorid, PyBop: Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat.

Als Kupplungsreagenz wurde bei der Synthese des Amids **168a** Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat (PyBop) verwendet, da in der Literatur bessere Ausbeuten (> 90%) bei der Verwendung dieses Aktivierungsreagenzes beschrieben wurden.^{126–128} Jedoch wurde bei der Synthese des Amids **168a** keine vergleichbare Ausbeute erzielt. Wahrscheinlich wurde die Ausbeute der Kupplungsreaktion durch eine konkurrierende, baseninduzierte 1,4-Addition der Aminofunktion an der Doppelbindung zum Substrat **169** reduziert (Abbildung 76).

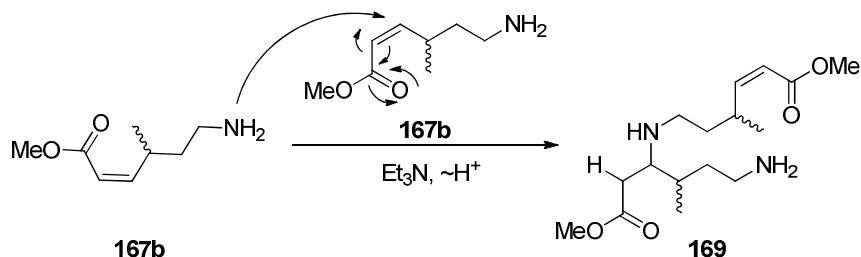


Abbildung 76: Dimerisierung des Amins **167b** durch eine 1,4-Addition zum Substrat **169**.

Für die Darstellung des δ -Methoxythioesters **79** sollte zunächst das Amin **170b** synthetisiert werden (Abbildung 77). Die Grignard-Addition des 3-Bromprop-1-in (**86**) an das geschützte Glycinal **85** ergab das Alkin **87a** in 42% Ausbeute.^{129,130} Anschließend wurde der Alkohol **87a** zum Ether **87b** in 52% Ausbeute methyliert.¹³¹ Die baseninduzierte Substitutionsreaktion des Alkins **87b** mit Chloressigsäureethylester ergab nur den zweifach substituerten Ester **170a** mit 76% in guter Ausbeute.¹³² Alle Versuche, unter milden Bedingungen den Ester **170a** zum Amin **170b** zu entschützen gelangen nicht. Die Ethylcarbamatgruppe kann nur unter stark basischen Bedingungen abgespalten werden.¹³³ Diese Bedingungen würden aber auch den Ester verseifen.

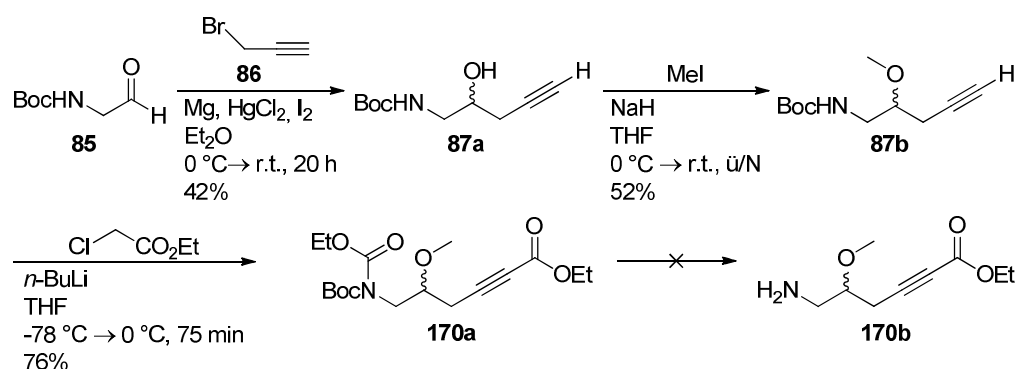


Abbildung 77: Versuch der Synthese des Alkins **170b** mittels Grignard-Addition an *N*-Boc-2-aminoacetaldehyd (**85**); Et₂O: Diethylether.

Die Ausbeute der Grignard-Addition wurde durch die Optimierung der Reaktionsbedingungen im Vergleich zur Literatur um 10% verbessert.^{129,130} In der Literaturvorschrift wurde zunächst das Grignard-Reagenz hergestellt und dieses dann zum Aldehyd **85** gegeben. Problematisch bei der Reaktion ist jedoch die Instabilität des Propinylmagnesiumbromids (**171a**) (Abbildung 78).^{134,135} Nach der Bildung der Grignardverbindung **171a** kann diese, neben der gewünschten Reaktion zum Produkt **171b**, auch das Acetylenproton von Brompropin **86** unter Ausbildung von Propin (**173a**) abstrahieren. Dieses reagiert direkt zum Grignardreagenz **173b**, das an Elektrophile (E⁺) unter Ausbildung des Alkins **173c** addiert. Die Grignardspezies **171a** kann auch zum Allenderivat **172a** umlagern, die mit E⁺ das Allen-substrat **172b** bildet.

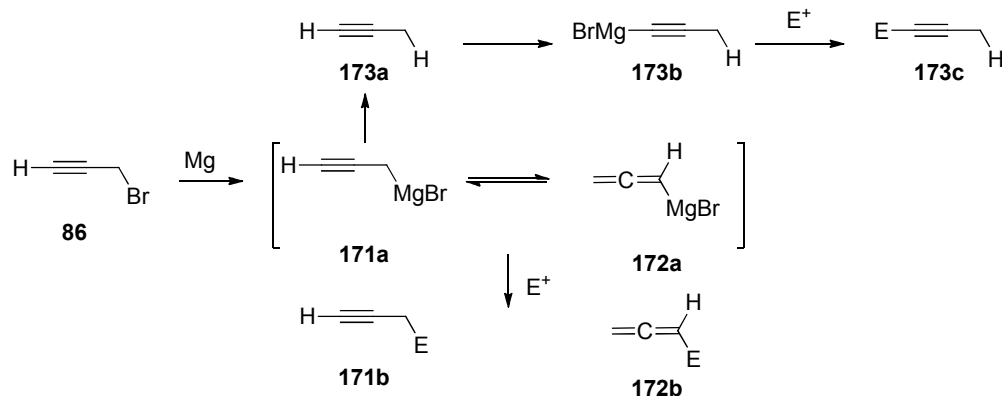
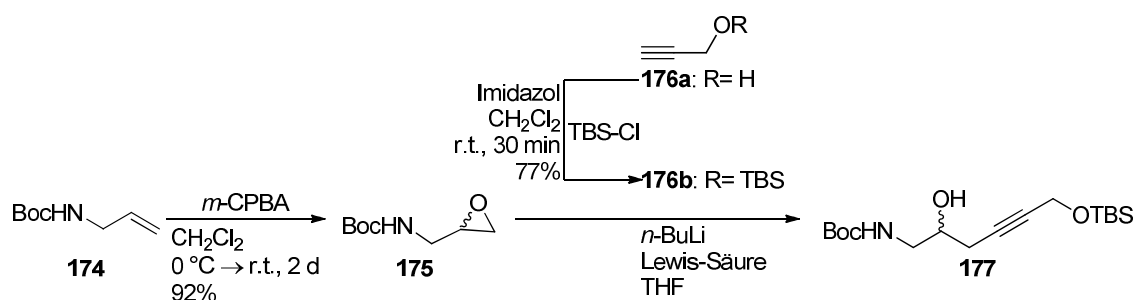


Abbildung 78: Reaktionsprodukte des Grignards **171a** mit Elektrophilen (E^+).

Bei der durchgeführten Synthese wurde entgegen der Literaturvorschrift nach dem Einsetzen der Grignardbildung eine Lösung aus dem Bromalkin **86** und dem Aldehyd **85** zugetropft. Dadurch konnte der Grignard **171a** direkt an den Aldehyden **85** zum gewünschten Produkt **87a** addieren. Da die Grignard-Reaktion die erste Stufe der Synthesesequenz zur Darstellung des Thioesters **79** ist, ist die nur auf 42% optimierte Ausbeute nicht zufriedenstellend.

Alternativ zu der Grignard-Addition-basierten Synthese wurde ein Ansatz über eine Epoxidöffnung zur Darstellung des Alkins **177** getestet (Abbildung 79). *N*-Boc-Allylamin (**174**) wurde in 92% Ausbeute zum Oxiran **175** epoxidiert.¹³⁶ Anschließend wurde das Epoxid **175** durch baseninduzierte nukleophile Addition des Alkins **176b** zum sekundären Alkohol **177** geöffnet. Alle Versuche die Ringöffnungsreaktion mit Bortrifluorid-Komplexen zu katalysieren, gelangen nicht. Es wurden nur die Edukte reisoliert. Die mit Dimethylaluminiumchlorid aktivierte Reaktion ergab den sekundären Alkohol **177** lediglich in 42% Ausbeute.¹³⁷ Aufgrund der schlechten Ausbeute in einer frühen Stufe einer linearen Multistufensequenz eignete sich der Ansatz nicht zur Darstellung des Thioesters **79**.



| Lewissäure | Reaktionsbedingungen | Ausbeute |
|---|-----------------------------------|----------|
| $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ | -78°C , 4 h | 0% |
| $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ | -78°C auf r.t., ü/N | 0% |
| $\text{BF}_3 \cdot \text{THF}$ | -78°C , 4 h | 0% |
| Me_2AlCl | -20°C auf r.t., 4 h | 0.41% |

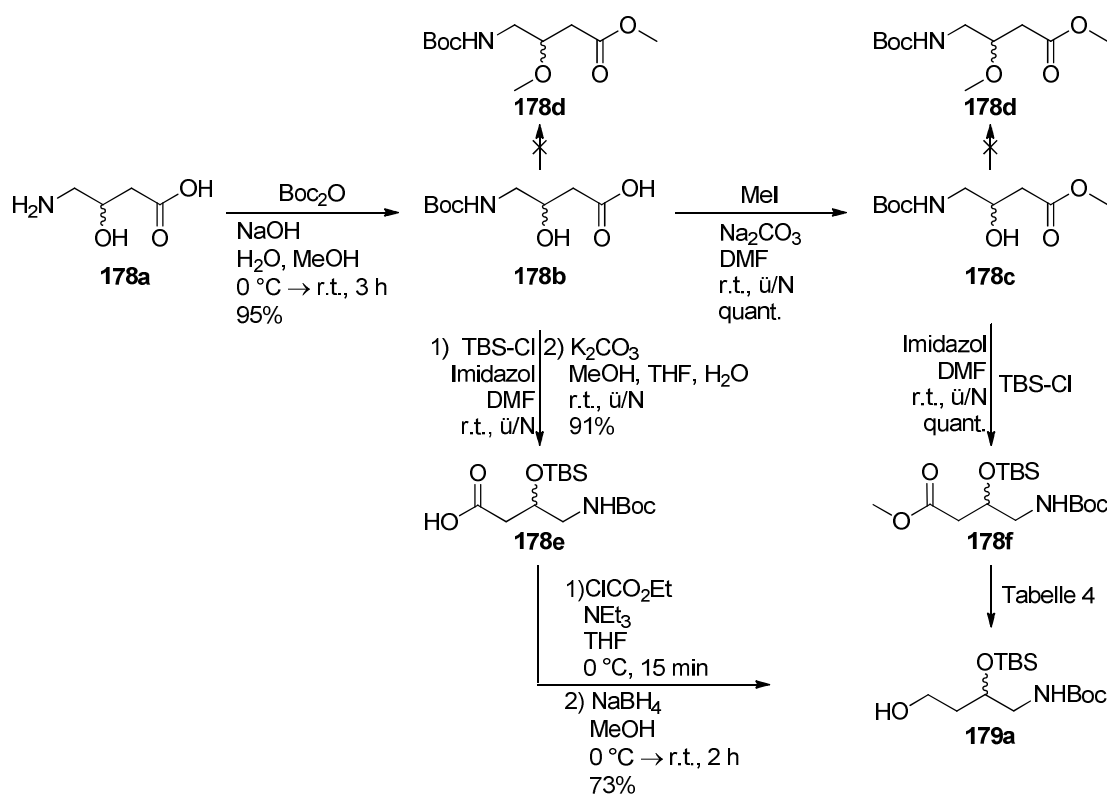
Abbildung 79: Versuch der Synthese des Alkins **177** über einen nukleophilen Angriff am Epoxid **175**; *m*-CPBA: *meta*-Chlorperbenzoesäure (engl. *meta*-Chlorperbenzoic acid), Me_2AlCl : Dimethylaluminiumchlorid.

Da weder der Grignard-, noch der Epoxid-Ansatz für die Synthese des Zielsubstrats **79** geeignet waren, wurde eine neue Synthesestrategie entwickelt, bei der zunächst eine Sequenz zur Darstellung des Schlüsselintermediats **179a** etabliert wurde (Abbildung 80). γ -Aminobuttersäure (**178a**) wurde baseninduziert zum Amin **178b** in 95% Ausbeute geschützt.¹³⁸ Der Versuch, die Säure **178b** zum Derivat **178d** zu methylieren, gelang nicht, sodass zunächst der Methylester **178c** in quantitativer Ausbeute dargestellt wurde.^{113,139} Auch der Versuch, die Hydroxygruppe des Esters **178c** zu methylieren, war nicht erfolgreich.¹³¹ Durch die Methylierung der Hydroxygruppe wäre die Hydroxyfunktion direkt mit der gewünschten Funktionalität im Zielsubstrat **79** geschützt worden. Hingegen ergab die Reaktion des Esters **178c** mit TBS-Cl den Silylether **178f** in sehr guter Ausbeute.¹⁴⁰ Wahrscheinlich begünstigt die starke O-Si-Bindung die Reaktion zum geschützten Ester **178f** im Vergleich zur Methylierungsreaktion. Für die Reduktion des Esters **178f** zum Alkohol **179a** wurden verschiedene Methoden getestet (Tabelle 4). Bei der Reduktion des Esters **178f** mittels Lithiumaluminiumhydrid wurde nur die Zersetzung des Eduktes beobachtet.¹⁴¹ Die auf NaBH_4 basierenden Reduktionen ergaben den gewünschten Alkohol **179a** in schlechten Ausbeuten, sodass diese Methoden als ungeeignet verworfen wurden.^{142,143} Die mit Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAL-H) initiierte Reduktion ergab den Alkohol **179a** mit 57% in zufriedenstellender Ausbeute.¹⁴⁴ Diese Methode ist jedoch nur in kleinen Ansätzen praktikabel, sodass eine alternative Syntheseroute verfolgt wurde.

Tabelle 4: Versuchte Reduktionsmethoden zur Synthese des Alkohols **179a**.

| Methode | Eigenschaften |
|-------------------------------|---|
| LiAlH_4 | Zersetzung |
| NaBH_4 | niedrige Ausbeute (10%) |
| $\text{CaCl}_2/\text{NaBH}_4$ | niedrige Ausbeute (15%) |
| DIBAL-H | gute Ausbeute (57%), nur für kleinen Ansatz geeignet |

Ausgehend von der Säure **178b** wurde die Hydroxyfunktion als Silylether **178e** mit 95% in sehr guter Ausbeute geschützt (Abbildung 80).¹⁴⁵ Anschließend wurde Säure **178e** mit Chloressigsäureethylester *in situ* als gemischtes Carbonat aktiviert, das mit Natriumborhydrid zum Alkohol **179a** reduziert wurde.¹⁴⁶ Die Reduktion gelang mit 73% in vergleichbarer Ausbeute zur Literatur. Im Gegensatz zu der Reduktion des Esters **178f** mit DIBAL-H ist die Reduktion der Säure **178e** mit NaBH_4 auch im Multigrammansatz durchführbar. Außerdem kann mit dieser Methode die Buttersäure **179a** in drei Stufen zum Alkohol **185a** derivatisiert werden, sodass im Vergleich zur Reduktion mit DIBAL-H die Synthesesequenz um eine Reaktionsstufe reduziert wurde.

**Abbildung 80:** Synthese des Alkohols **179a** ausgehend von 4-Amino-3-hydroxybuttersäure (**178a**).

Nach der Synthese des Schlüsselintermediats **179a** wurde zunächst eine lineare Synthesestrategie analog der des Thioesters **76** verfolgt. Dabei wurde der Alkohol **179a** als Benzylether **179b** geschützt (Abbildung 81). Anschließend wurde versucht, säurekatalysiert die Aminofunktion zu entschützen.^{92,147} Es wurde eine Mischung aus dem Derivat **179c** und dem Alkohol **179d** erhalten.

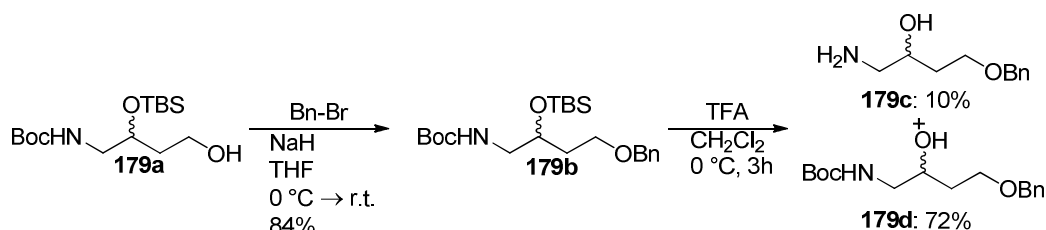


Abbildung 81: Versuch der selektiven Aminoentschützung von Substrat **179b**.

Aufgrund der wesentlich höheren Säurestabilität der *tert*-Butyldiphenylsilylgruppe (TBDPS) im Gegensatz zur TBS-Funktionalität wurde der Alkohol **179** daraufhin als Silylether **179e** geschützt (Abbildung 82).¹³³ Der Silylether **179e** wurde dabei mit 91% in sehr guter Ausbeute erhalten. Die mit Trifluoressigsäure (engl. Trifluoroacetic acid, TFA) katalysierte Entschützung ergab das Amin **179f** mit lediglich 31% Ausbeute.¹⁴⁸ Durch die mit EDC-HCl initiierte Peptidkupplung wurde das Amid **180a** in 58% Ausbeute dargestellt.⁶⁴ Anschließend wurde die Benzylschutzgruppe Palladium-katalysiert abgespalten und der primäre Alkohol **180b** wurde in 71% Ausbeute erhalten.⁹⁷

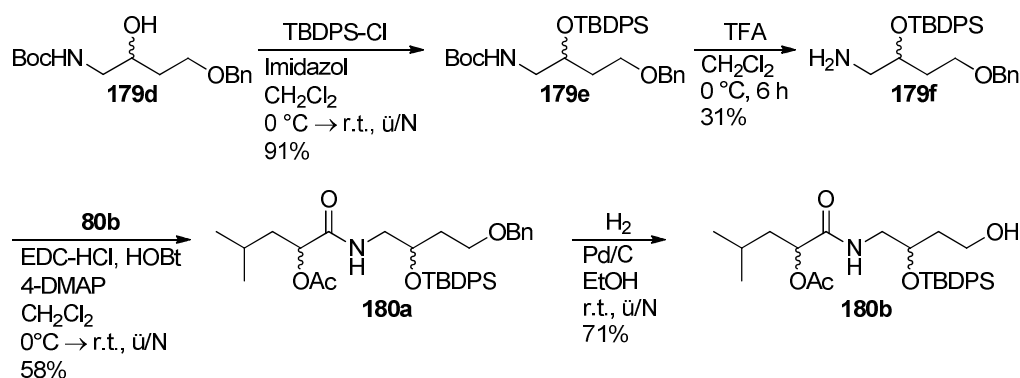


Abbildung 82: Synthese des Alkohols **180b**; TBDPS-Cl: *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid.

Die Synthese war jedoch aufgrund der schlechten Ausbeute von 31% bei der Entschützung zum Amin **179f** und der kostspieligen *tert*-Butyldiphenylsilylschutzgruppe ineffektiv zur Darstellung des Alkohols **180b**. Zudem wurden Probleme bei der Kombination aus Oxidation und Still-Gennari-Olefinierung erwartet, da der *in situ* zu generierende Aldehyd wahrscheinlich zum Halbaminal zyklisiert (vgl. Abbildung 74).¹²³

Deshalb wurde das Substrat **179e** analog der Literatur zunächst in das Di-Boc-Amin **179g** mit 90% Ausbeute überführt (Abbildung 83).¹²⁵ Der anschließende Versuch, die primäre Hydroxygruppe mittels Hydrierung zu entschützen, gelang jedoch nicht.

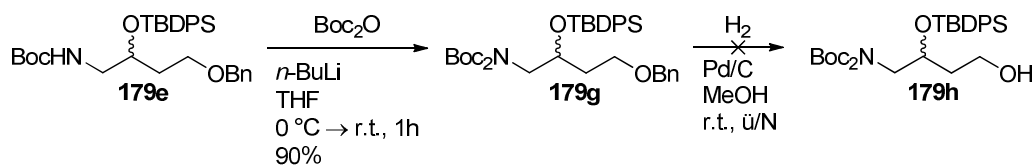


Abbildung 83: Versuch der Synthese des Alkohols **179h**.

Wahrscheinlich verhindern die TBDPS- und die Di-Boc-Funktionalität aufgrund ihrer anspruchsvollen Sterik eine erfolgreiche Anlagerung des Substrats **179g** an die Palladium-Oberfläche, sodass die Hydrierung nicht katalysiert werden kann.

Sowohl die selektive Aminoentschützung des TBS-geschützten Substrats **179b** als auch die Hydrierung des TBDPS-geschützten Substrats **179g** gelangen nicht. Deshalb wurde ausgehend von dem Substrat **179b** eine neue Syntheseroute entwickelt, bei der das Amin **182d** als Schlüsselintermediat synthetisiert wurde (Abbildung 84). Die baseninduzierte Einführung der zweiten Boc-Schutzgruppe ergab das Di-Boc-Amin **179i** in 86% Ausbeute.¹²⁵ Anschließend wurde mittels Palladium-katalysierter Hydrierung der primäre Alkohol **179j** mit 63% in moderaten Ausbeuten erhalten. Unter Swern-Bedingungen wurde der Alkohol **179j** zum Aldehyd **181** mit 83% in vergleichbarer Ausbeute zur Literatur oxidiert.¹²⁵ Die baseninduzierte Still-Gennari-Olefinierung ergab den *cis*-konfigurierten, α,β -ungesättigten Methylester **182a** mit 83% in sehr guten Ausbeuten.¹¹⁴ Die mit Flusssäure katalysierte Spaltung des Silylethers **182a** ergab den sekundären Alkohol **182b** nur in 52% Ausbeute.¹¹⁰ Wahrscheinlich blockieren die beiden Boc-Schutzgruppen das Siliziumatom des TBS-Ethers **182a**, sodass selbst das kleine Fluorid-Ion nur schlecht am Silicium angreifen kann. Die freie Hydroxygruppe wurde anschließend basenkatalysiert mit Methyltrifluormethansulfonat (MeOTf) zum Ether **182c** methyliert. Die Ausbeute von 73% lag dabei 18% niedriger als die Literaturausbeute.¹⁴⁹ Auch bei dieser Reaktion scheinen die beiden Boc-Schutzgruppen den Angriff des Methylierungsreagenzes zu hemmen. Die Abspaltung der beiden Boc-Schutzgruppen zum Amin **182d** gelang in quantitativer Ausbeute.¹⁰⁰ Die Peptidkupplung zwischen der Säure **80b** und dem Amin **182d** ergab das Amid **183a** mit 59% in guter Ausbeute. Anschließend wurde der Methylester **183a** zur Säure **183b** in 70% Ausbeute verseift.¹⁵⁰ Die Entschützung wurde dabei mit wässriger NaOH katalysiert, da alle auf LiOH-basierenden getesteten Verseifungsreaktionen zur Eliminierung der Methoxy-

gruppe unter Ausbildung einer α - δ -ungesättigten Diensäure führten. Durch die mit EDC-HCl initiierte Kupplungsreaktion der Säure **183b** mit dem Thiol **120** wurde das Zielsubstrat **79** in 13% Ausbeute dargestellt. Die schlechten Ausbeuten sind zum einen auf eine konkurrierende Addition der sekundären Hydroxygruppe an der aktivierten Säure **183b** und zum anderen auf eine Michael-Addition des Cysteamins **120** zurückzuführen (vgl. Abbildung 76).

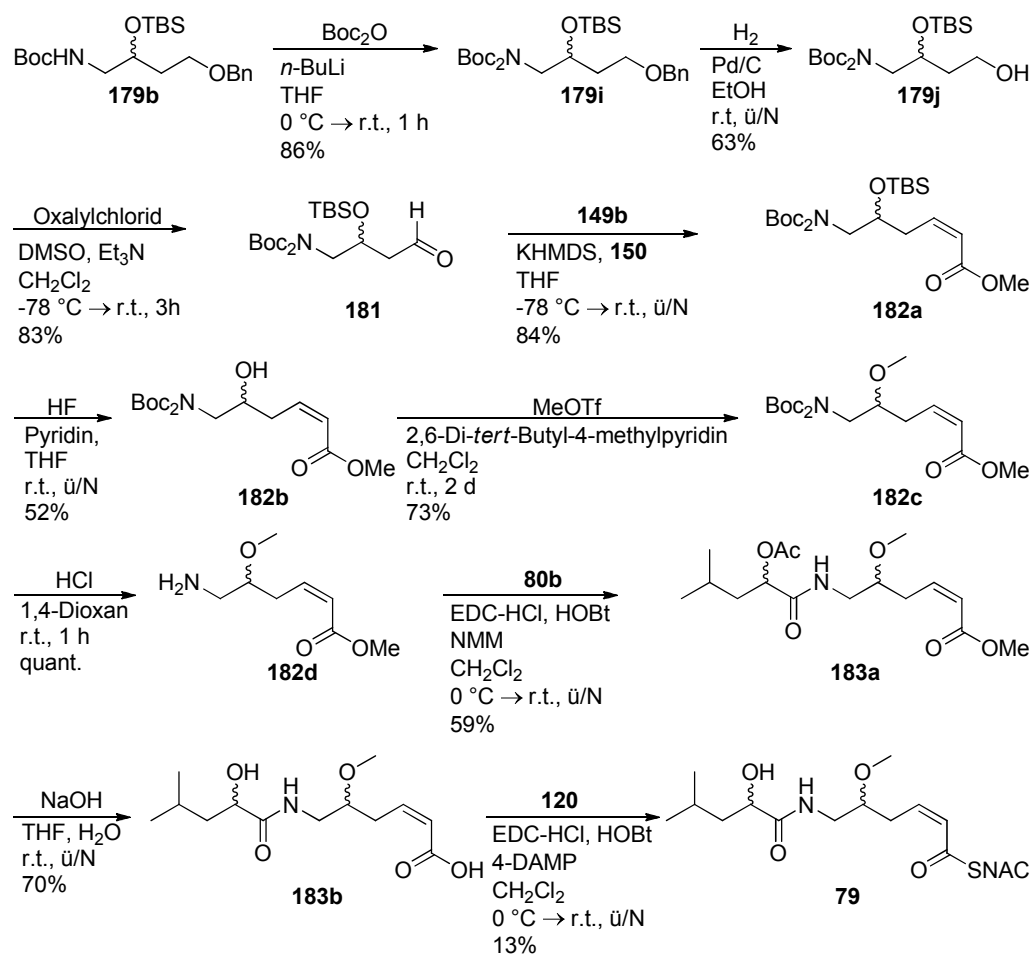


Abbildung 84: Synthese des SNAC-Thioesters **79**; MeOTf: Methyltrifluormethansulfonat.

Fazit: Der SNAC-Thioester **76** wurde über acht lineare Stufen in einer Gesamtausbeute von 130 mg (3.32%) dargestellt. Die Synthese des *trans*-konfigurierten Substrats **77** über acht lineare Stufen gelang mit einer Gesamtausbeute 20 mg (4.25%).

Aufgrund der Zyklisierungstendenz von 4-Aminoaldehyden zum Halbaminale wurde für die Synthese des methylierten Substrats **78** das Amin **160a** zunächst Di-Boc-geschützt. Dadurch war keine intramolekulare Zyklisierung mehr möglich, und der Aldehyd **166** wurde in guten Ausbeuten isoliert. Auch die folgende Olefinierungsreaktion ergab den

ungesättigten Ester **167a** in literaturüblicher Ausbeute. Insgesamt wurde der Thioester **78** in zehn linearen Stufen mit einer Gesamtausbeute von 130 mg (2.36%) dargestellt.

Durch eine Reduktion von 3-Hydroxy-4-Aminobuttersäure (**178a**) wurde das Schlüsselintermediat **179a** hergestellt, das in elf Stufen zum Zielsubstrat **79** umgesetzt wurde. Insgesamt wurde der Thioester **79** in 14 linearen Syntheseschritten mit einer Totalausbeute von 60 mg (0.76%) hergestellt.

3.1.5 Resümee und Folgerungen für die kombinatorische Biosynthese

In-silico-Analysen ergaben, dass die Gensequenz einer *trans*-AT-Ketosynthase mit der Struktur des prozessierten Intermediats korreliert.²⁶ Bislang konnte jedoch noch nicht nachgewiesen werden, ob diese Sequenzkorrelation auch in einer Substratspezifität der KS-Domänen resultiert. Die hier präsentierte *In-vitro*-Studie ermöglichte den ersten funktionalen Einblick in die Substratspezifität von *trans*-AT-Ketosynthasen.

Das für diese Studien entwickelte Analyseverfahren eignete sich für eine schnelle und aussagekräftige Untersuchung von Ketosynthasen. Dabei wurden synthetisierte SNAC-Substrate in Proteinassays mit den KS-Domänen inkubiert. Die Beladung des Proteins mit dem jeweiligen Substrat wurde mittels ESI-MS-Analyse nachverfolgt. Die Ergebnisse zeigten, dass dabei sowohl kurzkettige, repräsentative SNAC-Thioester, als auch Volllängensubstrate zuverlässige Daten liefern. Es wurden verschiedene KS aus der Bacillaen- und Psymberin-Biosynthese auf deren Substratspezifität untersucht. Die Studien zeigten, dass die Spezifität in den getesteten Domänen unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Für die Untersuchung der Bacillaen KS 4 wurden Substrate synthetisiert, die nach erfolgreicher Expression der Domäne in Folgearbeiten zur Testung der KS 4-Spezifität verwendet werden können. Dies würde erste Erkenntnisse zur Substrattoleranz einer KS liefern, die ein α,β -ungesättigtes Intermediat prozessiert.

Bislang war es schwierig, funktionale Einsichten in modulare Komponenten von *trans*-AT-PKS zu erhalten. Mit der entwickelten Methode ist es in Zukunft möglich, neue *trans*-AT-Cluster über gut reproduzierbare Assays zu charakterisieren. Ähnlich dem Colinearitätsprinzip für *cis*-AT-PKS kann anhand der gefundenen Substratspezifität in vielen Fällen die Struktur des prozessierten Intermediats vorhergesagt werden. Daraus kann man wiederum auf die Struktur des produzierten Polyketides schließen und gezielt in Rohextrakten nach dem produzierten *trans*-AT-Polyketid suchen.

Anhand der *in vitro* bestätigten, bis zur β -Position existierenden Substratspezifität kann eine Regel für die kombinatorische Biosynthese formuliert werden. Eine KS-Domäne prozessiert nur Substrate, die zu ihrer Spezifität passen. Intuitiv würde man bei der Erzeugung künstlicher *trans*-AT-PKS ein komplettes Modul ersetzen (Abbildung 85 **A**). Basierend auf unseren Erkenntnissen würde die nachfolgende KS jedoch in vielen Fällen das neue Intermediat nicht prozessieren können, da dessen Struktur nicht mit der KS-Substratspezifität korreliert. Die Biosynthese würde an dieser Stelle also voraussichtlich stoppen. Alternativ sollte daher die KS des auszutauschenden Moduls im modifizierten System verbleiben und dafür die KS des folgenden Moduls mit eingeführt werden (Abbildung 85 **B**). Dieser Austausch wird mit größerer Wahrscheinlichkeit zu künstlichen Polyketiden führen, da die Spezifität der neu eingesetzten KS so auch zur Struktur des Intermediats passt und somit die wachsende Kette weiter prozessiert werden kann.

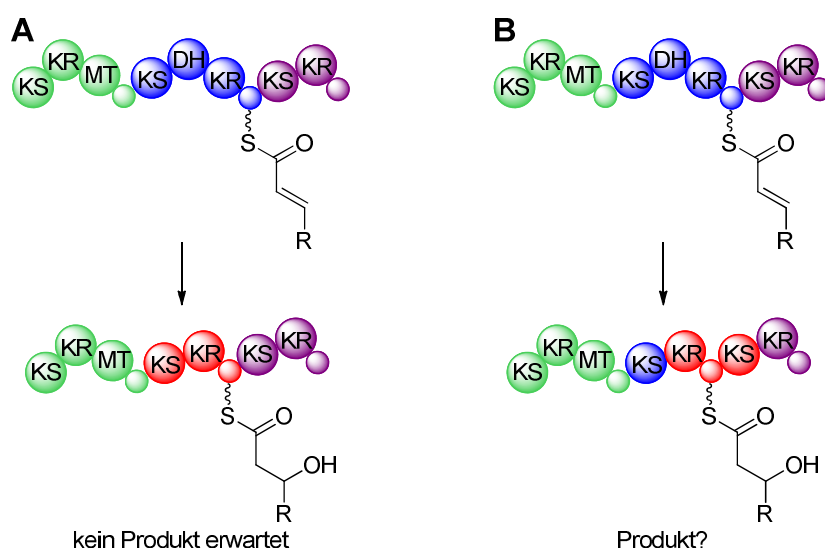


Abbildung 85: Regel für die kombinatorische Biosynthese von *trans*-AT-PKS-Systemen: Hypothetischer Modulaustausch (Blau gegen Rot) **A**) Der Austausch eines Moduls führt vermutlich zu keinem künstlichen Polyketid, da die nachfolgende KS aufgrund ihrer Substratspezifität das neue Intermediat nicht weiter prozessiert, **B**) Der Austausch von Domänen mit zugehöriger KS-Domäne aus dem folgenden Modul führt wahrscheinlich zu nicht-natürlichen Polyketiden.

3.2 Synthese von Substraten zur Untersuchung der Pyranbiosynthese in der Misakinolid A-PKS

Misakinolid A (**24**) wurde aus dem Schwamm *Theonella swinhoei* isoliert und wirkt inhibierend auf die Actin-Polymerisation.³¹ Der Produzent ist dabei ein symbiotisches Bakterium, das mit dem jetzigen Stand der Technik nicht kultivierbar ist (A. Uria, J. Piel, unveröffentlicht). Im Rahmen der Promotionsarbeit von Dr. Agustinus Uria (AG Piel) wurde die Biosynthese des Polyketids **24** postuliert (Abbildung 13). In Modul 15 wurde eine putative Pyransynthasedomäne entdeckt, für die eine Ringschlussreaktion durch

intramolekulare Addition der ζ -Hydroxygruppe an der β -Position postuliert wurde (vgl. Abbildung 42). Auch in anderen *trans*-AT-PKS wurden putative PS-Domäne entdeckt, beispielsweise in der Psymberin-Biosynthese (vgl. Abbildung 26). Bislang wurde für PS die Funktion zum Aufbau von Tetra- oder Dihydropyranen biochemisch noch nicht bewiesen. Deshalb untersucht Petra Pöplau (AG Piel) im Rahmen ihrer Promotionsarbeit die katalytische Aktivität von PS *in vitro*. Für die Proteinassays mit der exprimierten PS-Domäne aus der Misakinolid-PKS wurde sowohl das zyklische Substrat **90**, als auch der offenkettige Thioester **91** synthetisiert. Bislang wurden Inkubationsversuche mit den zur Verfügung gestellten Substraten **90**, **91** noch nicht durchgeführt, sodass im Folgenden nur die Ergebnisse der Synthese der Verbindungen **90** und **91** gezeigt und diskutiert werden.

Die Synthese des Pyranintermediats **96b** erfolgte analog der Literatur.^{90,91} Unter basischen Bedingungen wurde zunächst eine Hydroxygruppe des 1,3-Propandiols (**92a**) in 93% Ausbeute TBS-geschützt (Abbildung 86). Anschließend wurde der Alkohol **92b** mit Pyridiniumchlorochromat (PCC) in 70% Ausbeute zum Aldehyd **93** oxidiert. Nach der Schützung des Alkinols **94a** mit Trimethylsilylchlorid (TMS-Cl) zum Alkin **94b** in 78% Ausbeute wurde der sekundäre Alkohol **95a** durch die baseninduzierte, nukleophile Addition des Alkins **94b** an den Aldehyd **93** hergestellt. Das bis-silylierte Triol **95a** wurde in 80% Ausbeute erhalten. Die selektive Abspaltung der TMS-Schutzgruppe unter schwach basischen Bedingungen ergab das monosilylierte Triol **95b** in 90% Ausbeute. Anschließend wurde das Alkin **95b** unter Lindlar-Bedingungen zum *cis*-Olefin **96a** in quantitativer Ausbeute hydriert. Die primäre Hydroxygruppe des Alkenols **96a** wurde durch die Reaktion mit *para*-Toluolsulfonsäurechlorid (Ts-Cl) als Tosylat **96b** in 70% Ausbeute aktiviert. Die anschließende baseninduzierte, intramolekulare Substitutionsreaktion ergab das Pyranderivat **97a** in 60% Ausbeute. Dieses wurde mit TBAF in 70% Ausbeute zum Alkohol **97b** entschützt. Die Oxidation des Alkohols **97b** unter Jones-Bedingungen ergab die Säure **98** in 33% Ausbeute.⁹² Anschließend wurde durch die Reaktion der Säure **98** mit dem Thiol **120** das Zielsubstrat **90** mit 60% in üblicher Ausbeute erhalten.¹⁰⁴ Die Synthese des Pyranderivats **97b** gelang ohne Probleme. Die Literaturausbeuten wurden dabei reproduziert. Die Jones-Oxidation ergab die Säure **98** mit 33% in geringerer Ausbeute verglichen mit der Literaturausbeute.⁹² Die moderate Ausbeute kann aus einer säureaktivierten Hydratisierung der Doppelbindung als Nebenreaktion resultieren.

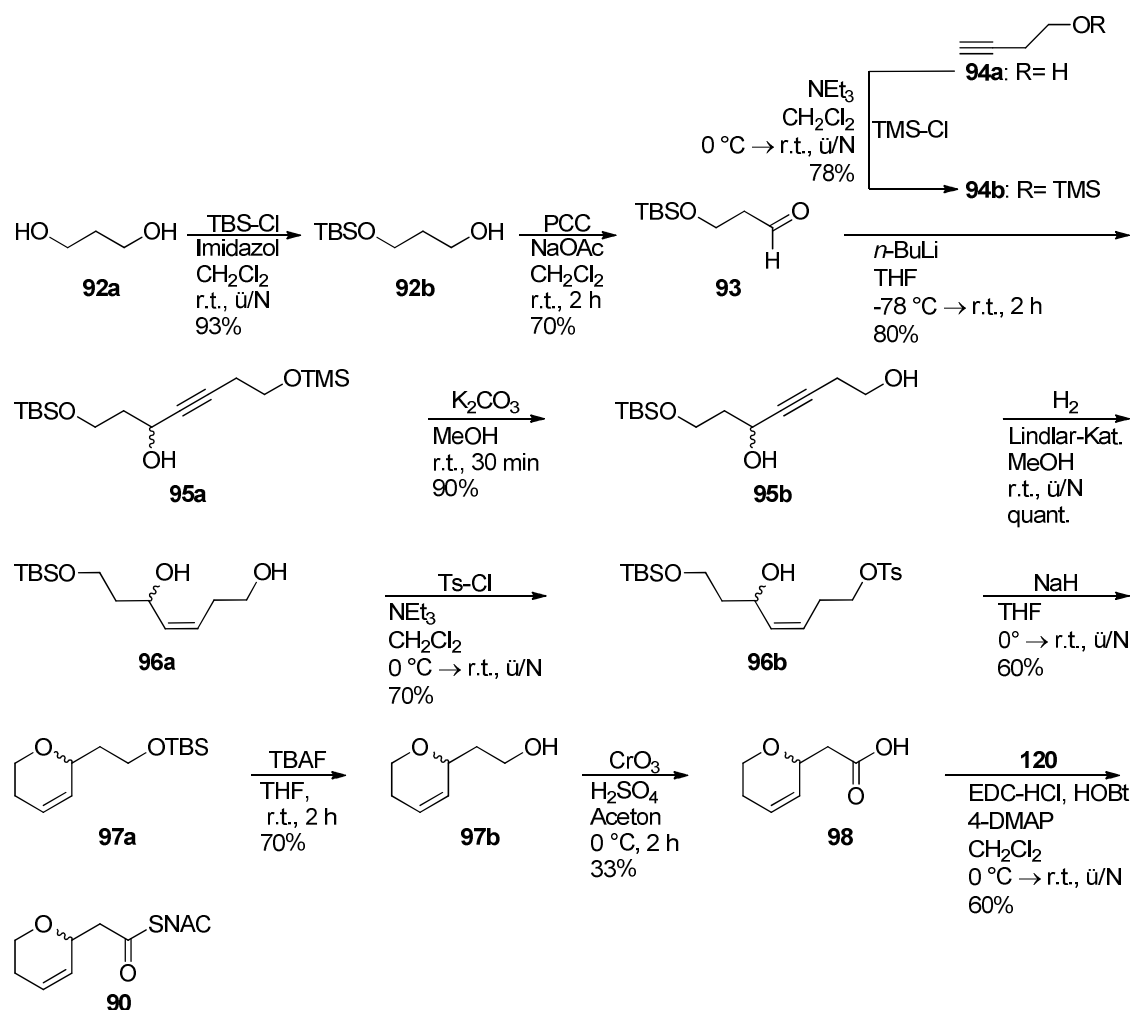


Abbildung 86: Synthese des Pyransubstrats **90**; PCC: Pyridiniumchlorochromat, NaOAc: Natriumacetat, TMS-Cl: Trimethylsilylchlorid, Ts-Cl: *para*-Toluolsulfonsäurechlorid.

Ausgehend vom Alkinol **94a** wurde zunächst die Hydroxygruppe als TBS-Ether **94c** in quantitativer Ausbeute geschützt (Abbildung 87).¹⁵¹ Die baseninduzierte Addition des Alkins **94c** an Paraformaldehyd ergab den primären Alkohol **100** mit 60% in Literatúrausbeute.^{152,153} Dabei wurden die Reaktionsbedingungen dahingehend optimiert, dass das Substrat **100** ohne Aufreinigung mittels Säulenchromatographie weiter verwendet werden konnte. Entgegen der Literaturvorschrift wurde die Reaktion nicht über Nacht auf Raumtemperatur (r.t.) erwärmt, sondern nach 2 h bei -78 °C abgebrochen und aufgearbeitet. Die anschließende Kombination aus Swern-Oxidation und Wittig-Olefinierung ergab den Ethylester **101a** mit 70% Aubeute.¹¹⁸ Baseninduziert wurde der Ester **101a** mit 52% in moderater Ausbeute zur Säure **101b** verseift.¹⁵⁴ Die mit EDC-HCl initiierte Thioesterbildung ergab das SNAC-Substrat **102a** mit 74% in üblicher Ausbeute.¹⁰⁴ Die Spaltung der Silyletherbindung unter milden Bedingungen mit Flusssäure ergab den primären Alkohol **102b** mit 71% in vergleichbarer Ausbeute zur Literatur.¹¹⁰ Alle Versuche, die Dreifachbindung des Thioesters **102b** zum

cis-konfigurierten Alken **91** zu hydrieren gelangen nicht. Sowohl bei der Hydrierung unter Lindlar-Bedingungen, als auch bei P2-Nickel-katalysierten Hydrierungen wurde nur das Edukt reisoliert.^{155–158} Ebenso scheiterten alle Versuche, das Alkin **102a** zu hydrieren. Wahrscheinlich vergiftet das Schwefelatom der Thioesterbindung die verwendeten Katalysatoren, sodass diese inaktiviert werden.¹³³

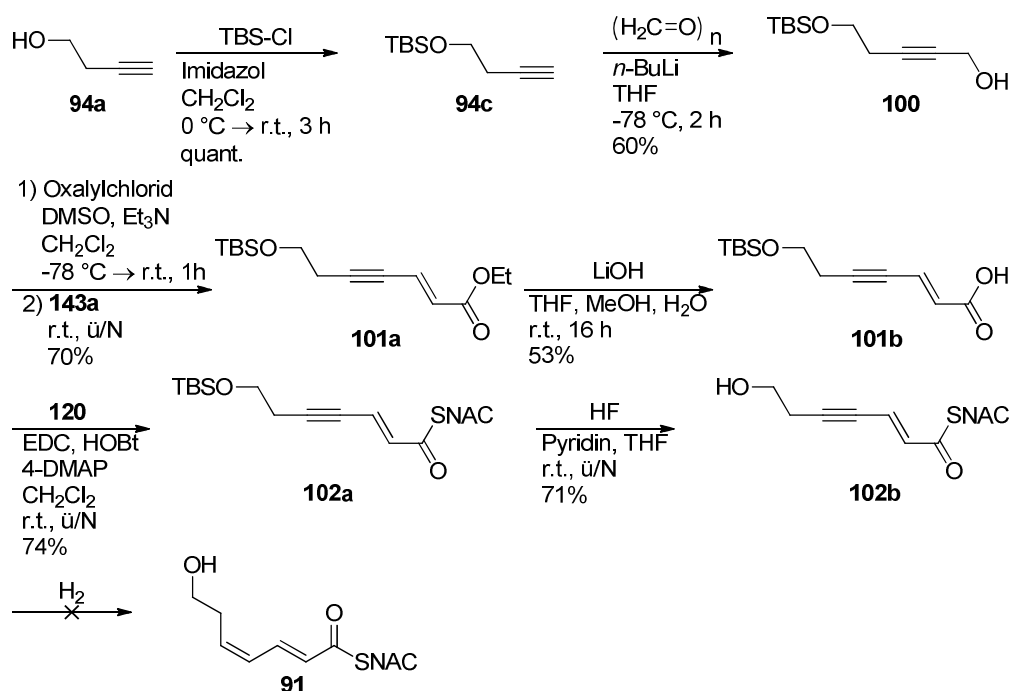


Abbildung 87: Versuch der Synthese des Thioesters **91** über eine späte Hydrierung des Alkins **102b**.

Da alle Versuche einer späten Hydrierung der Dreifachbindung misslangen, wurde eine neue Synthesestrategie entwickelt (Abbildung 88). Ausgehend von dem Alkinol **100** wurde zuerst die Dreifachbindung mit P2-Nickel katalysiert zum *cis*-Olefin **184** in 85% Ausbeute hydriert.¹⁵⁸ Dabei lag die Ausbeute leicht unter der Literaturausbeute. Da in den NMR-Spektren des Rohprodukts keine Verunreinigungen oder Eduktsignale vorhanden waren, wurde wahrscheinlich bei der Aufreinigung Produkt verloren. Die Kombination aus Swern-Oxidation und Wittig-Olefinierung ergab den Dienester **185a** mit 66% in gleicher Ausbeute zur Literatur.¹¹⁸ Durch die Verseifung des Esters **185a** mit LiOH wurde die Säure **185b** in 52% Ausbeute dargestellt.¹⁵⁴ Die mit EDC-HCl initiierte Reaktion zwischen der Säure **185b** und dem Thiol **120** ergab den Thioester **186** in 40% Ausbeute.¹⁰⁴ Durch Entschützung der primären Hydroxygruppe mit Flusssäure wurde das Zielsubstrat **91** in 34% Ausbeute erhalten.

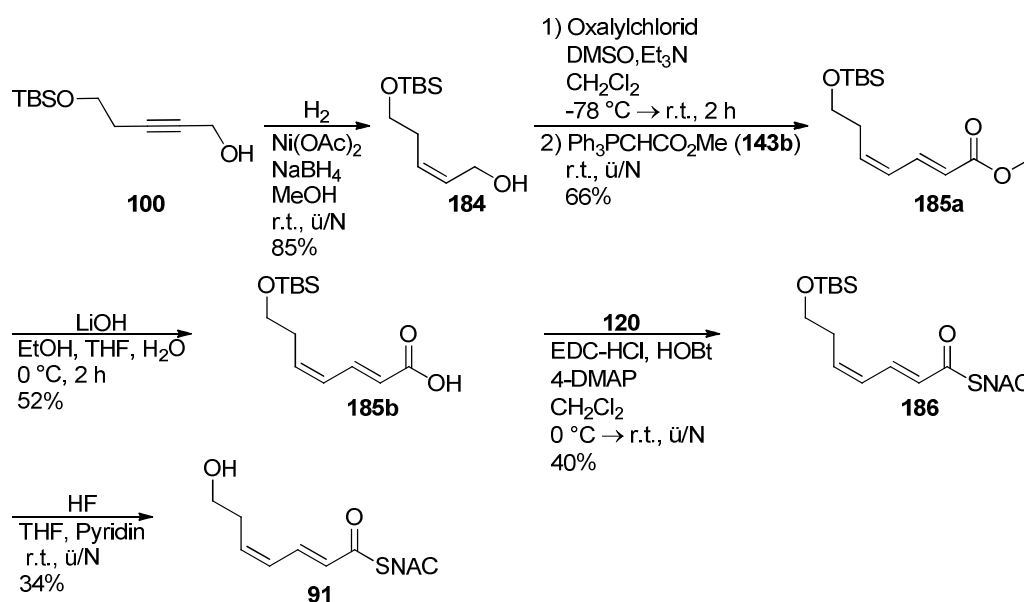


Abbildung 88: Synthese des offenkettigen Substrats **91** mittels früher Hydrierung des Alkins **100**.

Die Ausbeuten der letzten drei Syntheseschritte waren deutlich niedriger als die angegebenen Ausbeuten in der Literatur. Grund dafür ist die Instabilität des elektronenarmen Diens. Dieses ist anfällig gegenüber nukleophilen Angriff sowohl in 4-Position, als auch in 6-Position, sodass diese Nebenreaktionen die Ausbeute signifikant mindern.^{159,160}

Fazit: Der Thioester **90** wurde in elf linearen Syntheseschritten mit einer Gesamtausbeute von 150 mg (2.73%) dargestellt. Über eine frühe Hydrierung des Alkins **100** wurde der Thioester **91** in acht linearen Stufen mit einer Gesamtausbeute von 40 mg (2.38%) darstellt. In folgenden Inkubationsversuchen mit dem synthetisierten Thioester **91** und exprimierten PS-Domänen kann die katalytische Funktion der PS untersucht werden. Die zyklische Verbindung **90** kann dabei als Standard in den HPLC-Analysen dienen.

3.3 Synthese von *cis*-(*Z*)-4-Propenylprolin zur Untersuchung der Hormaomycin-Biosynthese

Das NRPS-Produkt Hormaomycin (**32**) besitzt neben seiner antibiotischen Aktivität auch eine Struktur mit ungewöhnlichen Aminosäurebausteinen (siehe Seite 17).^{48,51,53} In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass die nicht-proteinogene, bislang einzigartig in Natur, Aminosäure *cis*-(*Z*)-Propenylprolin im Makrolakton **32** inkorporiert ist.⁵¹ Xiaofeng Cai (AG Piel) untersucht im Rahmen ihrer Promotionsarbeit Gene, die in der Biosynthese des Peptids **32** involviert sind, deren genaue Funktion bislang aber

unbekannt ist.¹⁶¹ Für Fütterungsexperimente mit einer Knock-Out-Mutante wurde das Propenylprolin **109** analog der Literatur synthetisiert (Abbildung 89).^{48,92} Weiterhin wurde, unter anderem mit der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Aminosäure **109**, in Arbeiten von Dr. Max Crüsemann (AG Piel) die Substratspezifität der A-Domänen in der Hormaomycin-NRPS mittels Proteinassays analysiert.^{53,162}

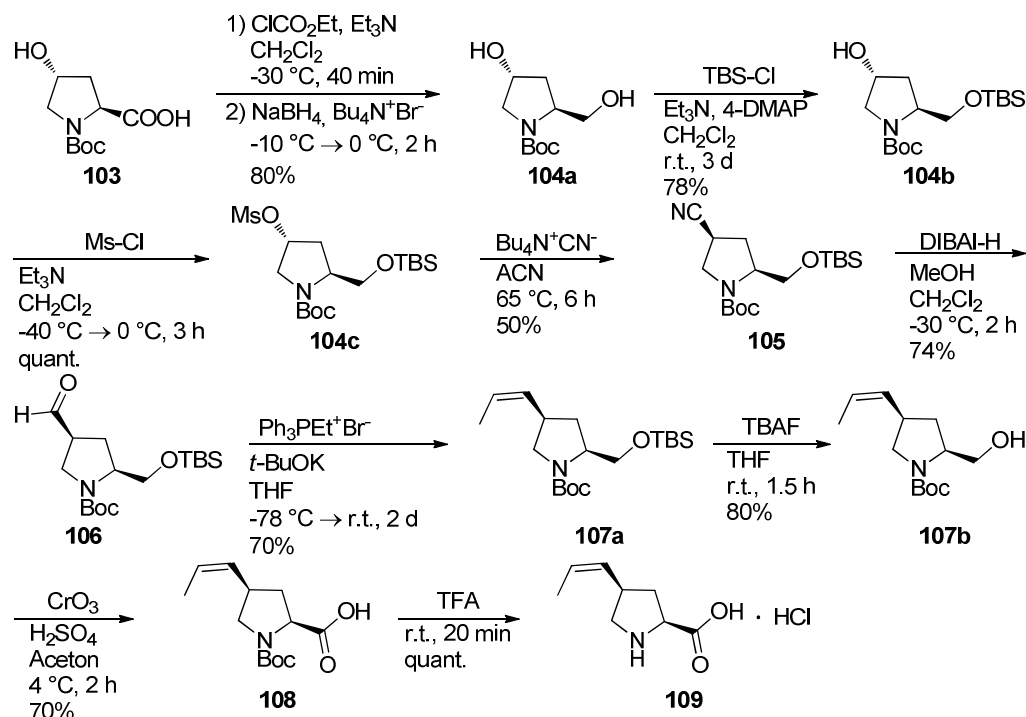


Abbildung 89: Synthese von *cis*-(Z)-4-Propenylprolin Hydrochlorid (**109**); $\text{Bu}_4\text{N}^+\text{Br}^-$: tetra-*n*-Butylammoniumbromid, MsCl: Methylsulfonylchlorid; $\text{Bu}_4\text{N}^+\text{CN}^-$: tetra-*n*-Butylammoniumcyanid, ACN: Acetonitril, $\text{Ph}_3\text{PET}^+\text{Br}^-$: Ethyltriphenylphosphoniumbromid, *t*-BuOK: Kalium-*tert*-butanolat.

Ausgehend vom kommerziell erhältlichen *trans*-N-Boc-4-Hydroxyprolin (**103**) wurde die Säurefunktion, nach Aktivierung als gemischtes Carbonat, mit Natriumborhydrid zum Prolinol **104a** in 80% Ausbeute reduziert (Abbildung 89). Die selektive Schützung der primären Hydroxygruppe mit TBS-Cl ergab den Silylether **104b** in 78% Ausbeute. Nach quantitativer Aktivierung der sekundären Hydroxygruppe zum Mesylderivat **104c** wurde durch eine Substitutionsreaktion mit tetra-*n*-Butylammoniumcyanid das *cis*-4-Cyanoprolinol **105** in 60% Ausbeute dargestellt. Die anschließende Reduktion des Nitrils **105** mit DIBAL-H ergab den Aldehyd **106** in 74% Ausbeute. Eine baseninduzierte Wittig-Olefinierung mit Ethyltriphenylphosphoniumbromid ergab das *cis*-konfigurierte Olefin **107a** in 70% Ausbeute. Nach der Entschützung der primären Hydroxygruppe mit TBAF in 80% Ausbeute, wurde das Prolinol **107b** unter Jones-Bedingungen zum N-Boc-Prolinderivat **108** in 70% Ausbeute oxidiert. Die folgende saure Entfernung der Boc-

Schutzgruppe ergab das Propenylprolin Hydrochlorid **109** in quantitativer Ausbeute. Die Synthese wurde in Literaturausbeuten reproduziert.^{48,92}

Durch Fütterungsexperimente mit einer *hrmD*-deletierten Mutante und dem synthetisierten Baustein **109** wurde von Xiaofeng Cai (AG Piel) gezeigt, dass HrmD in der Biosynthese des 4-Propenylprolinbausteins involviert ist.^{161,163} Die Mutante produzierte erst nach Zugabe der synthetisierten Aminosäure **109** wieder das Lacton **32**. Zudem wurde durch die Verfütterung des Prolins **109** an eine *hrmH*-Knock-Out-Mutante demonstriert, dass *hrmH* ein Regulatorgen für die Biosynthese des *cis*-(*Z*)-Propenylprolins ist.^{161,163} Weiterhin wurde von Max Crüsemann (AG Piel) im Rahmen seiner Promotionsarbeit die Substratspezifität der A-Domänen im Hormaomycin-Cluster untersucht. Enzymassays mit dem synthetisierten Prolin **109** und exprimierten Domänen belegten, dass die Aminosäure **109** sehr spezifisch von der korrespondierenden A-Domäne erkannt und prozessiert wird.^{53,162}

Fazit: Die Synthese des Propenylprolins 109 gelang analog der Literaturvorschrift in neun linearen Stufen mit 30 mg (9.05%) Gesamtausbeute. Fütterungsexperimente und Enzymassays mit dem Substrat 109 ergaben neue Einblicke in die Biosynthese des Hormaomycins (32).

3.4 Synthese von pcPNA-Oligomeren für die ARCUT-basierte Manipulation des Psymberinclusters

Das hochpotent antikanzerogen-wirkende *trans*-AT-PKS-Produkt Psymberin (**47**) wird von einem symbiontischen Bakterium im Schwamm *Psammocinia* aff. *bulbosa* produziert.^{68,69,72} Mit dem jetzigen Stand der Technik ist das Bakterium unter Laborbedingungen nicht kultivierbar. Kombiniert mit einem niedrigen Produktionstiter des Sekundärmetabolits **47** im Produzenten sind Analysen der zugrundeliegenden PKS aufwendig. Im Endeffekt führte ein metagenomischer Ansatz zur Formulierung einer putativen Biosynthese, bei der *psyA* und *psyD* für den Aufbau des Polyketidgrundgerüsts kodieren (vgl. Abbildung 26).⁷² Für weitere Studien zum Psymberin (**47**) und dessen Biosynthese wurde in vorrangegangenen Arbeiten von Dr. Cristian Gurgui (AG Piel) die in der Psymberinbiosynthese involvierten Gene auf einem Plasmid assembliert. Nach der heterologen Expression des Plasmids wurde bislang aber noch keine Psymberinproduktion nachgewiesen. In aktuellen Studien soll daher das GFP-Reportergen hinter *psyD* ligiert werden und das modifizierte Plasmid heterolog in *E. coli* exprimiert werden. Da GFP nur bei korrekter Faltung des Proteins fluoresziert, können anhand der Fluoreszenzintensität die Kultivierungsbedingungen dahingehend optimiert

werden, dass das Psymberin-produzierende Protein erzeugt und damit der Produktionstiter von Psymberin (**47**) vermutlich gesteigert wird.⁹³ Für diese Studien ist es jedoch erforderlich die DNA des Psymberincluster-tragenden Plasmids selektiv hinter der *psyD*-Sequenz zu spalten. Da die Selektivität von kommerziell erhältlichen Restriktionsenzymen für diese gezielte Manipulation nicht ausreicht wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei pcPNA-Oligomere synthetisiert, die im ARCUT-System für die gezielte Spaltung des *psyD* eingesetzt werden sollten. Nach einem erfolgreichen Einsatz des ARCUT-Systems in der Psymberin-Studie kann das System auch in zukünftigen Arbeiten angewendet werden, bei denen eine spezifische Manipulation großer DNA-Stücke gefordert ist.

3.4.1 Synthese der nicht-kommerziell verfügbaren Monomeren

Für die Synthese der beiden pcPNA-Monomeren **114b** und **118b** wurde zunächst das Peptid-Rückgrat **189** über zwei Stufen analog der Literatur synthetisiert (Abbildung 90).⁸⁸ Ausgehend von Ethylendiamin (**187a**) wurde zunächst eine der beiden Aminogruppen durch die Reaktion mit Boc_2O in quantitativer Ausbeute geschützt. Die anschließende basenkatalysierte $\text{S}_\text{N}2$ -Reaktion der freien Aminogruppe des Diamins **187b** mit Bromessigsäureethylester (**188**) ergab den geschützten pcPNA-Rückgratbaustein **189** mit 76% Ausbeute in vergleichbaren Ausbeuten zur Literatur.⁸⁸

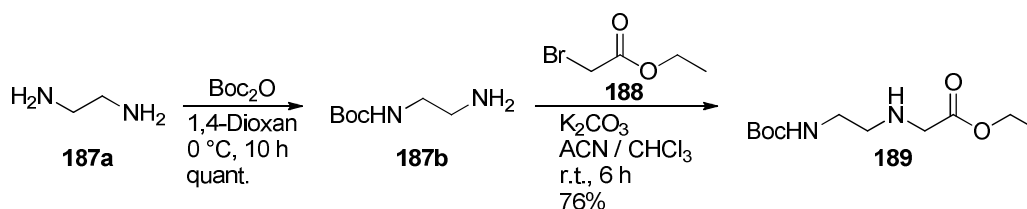


Abbildung 90: Synthese des Peptidrückgrats **189**.

Imidazol (**190**) wurde zunächst durch eine Additions-Eliminierungsreaktion in das Carbamat **191** in 70% Ausbeute überführt (Abbildung 91).⁸⁸ Durch die Reaktion des Imidazolderivats **191** mit Methyltrifluormethansulfonat wurde das Imidazoliumsalz **192** in quantitativer Ausbeute erhalten. Die Synthesen gelangen in vergleichbaren Ausbeuten zur Literatur.⁸⁸ Das in der Literatur auch als Rapoport-Reagenz beschriebene Imidazoliumderivat **192** wurde sowohl bei der Synthese des Diaminopurin-Bausteins **115b**, als auch bei der Festphasensynthese der pcPNA-Stränge zur Benzyloxycarbonyl-(Cbz)-Schützung freier Aminogruppen verwendet.

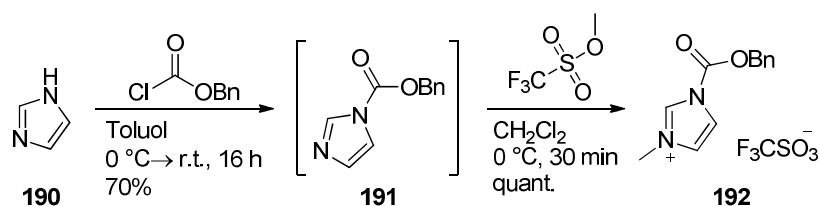


Abbildung 91: Synthese des Rapoport-Reagenz (193).

Die mit Base initiierte S_N2 -Reaktion des N-9-Atoms von 2,6-Diaminopurin (**53**) mit Bromessigsäureethylester (**188**) ergab das Purinderivat **114a** in 53% Ausbeute (Abbildung 92).⁸⁸ Anschließend wurde durch die Reaktion des Purins **114a** mit dem Rapoport-Reagenz (**192**) die C-6-Aminogruppe selektiv in 35% Ausbeute Cbz-geschützt. Die Verseifung des Ethylesters **114a** ergab die Säure **114b** in 90% Ausbeute. Die mit DCC und 3,4-Dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazin (DhbtOH) katalysierte Kupplung zwischen der Säure **114b** und dem Peptidrückgrat **189** ergab das Amid **115a** in 70% Ausbeute. Anschließend wurde der Ester **115a** baseninduzierte zum Diaminopurin-Baustein (D_M) **115b** in 50% Ausbeute hydrolysiert. Im letzten Syntheseschritt wurde die Aufreinigung des Substrats **115b** optimiert. Durch das Waschen des durch Ausfällung erhaltenen Rohprodukts **115b** mit Aceton wurden Verunreinigungen entfernt und das D_M **115b** wurde als weißer Feststoff erhalten. Die Synthese wurde in Literaturausbeuten reproduziert.⁸⁸

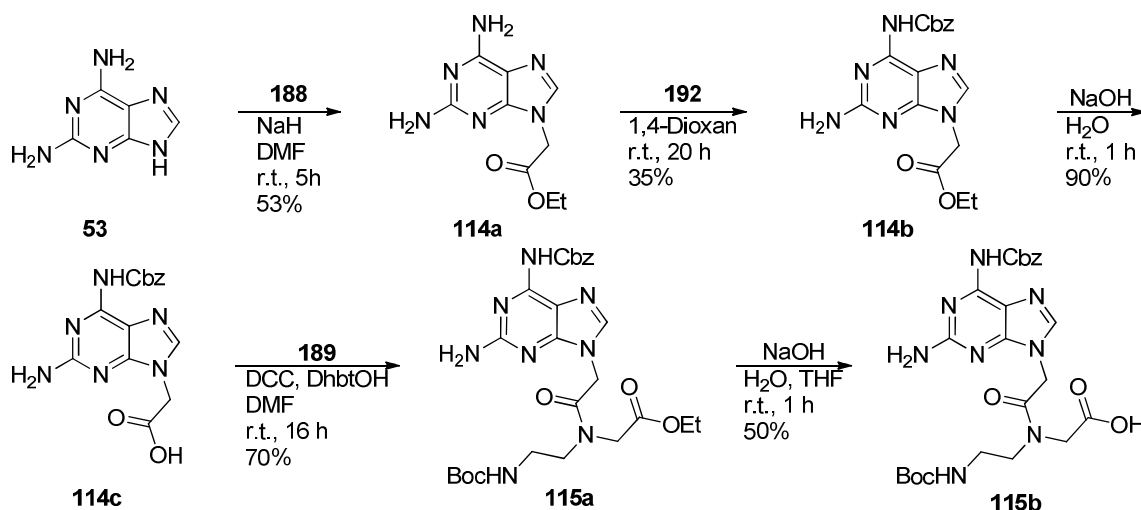


Abbildung 92: Synthese des Diaminopurin-Monomers **115b**; Cbz: Benzyloxycarbonyl, DhbtOH: 3,4-Dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazin.

Die Thiofunktion des 2-Thiouracils (**55**) wurde zunächst basenkatalysiert mit *para*-Methoxybenzoylchlorid (PMB-Cl) in 80% Ausbeute als Thioether **116** geschützt (Abbildung 93).⁸⁸ Die anschließende basisch induzierte S_N2 -Reaktion mit

Bromessigsäure-ethylester (**188**) ergab das Thiouracilderivat **117a** in 75% Ausbeute. Der Ethylester **117a** wurde mit LiOH zur Säure **117b** in 50% Ausbeute verseift. Die mit 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU) vermittelte Peptidkupplung des Rückgrats **189** an die Säure **117b** ergab das Amid **118a** in 80% Ausbeute. Anschließend wurde der Ester **118a** baseninduziert zum Thiouracil-Baustein ($U_{S,M}$) **118b** in 70% Ausbeute hydrolysiert. Die Literaturausbeuten wurden bei der Synthese reproduziert.⁸⁸

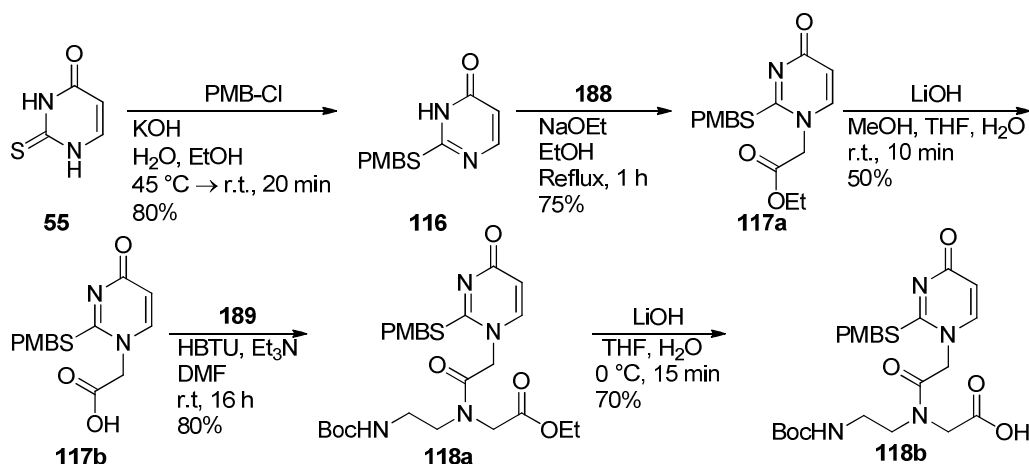


Abbildung 93: Synthese von Thiouracil-Monomers **118b**; PMB-Cl: *para*-Methoxybenzoylchlorid, NaOEt: Natriumethanolat, HBTU: 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat.

3.4.2 Untersuchung des Psymberin-Genclusters auf ARCUT geeignete Sequenzen

Die *psyD*-DNA wurde an ihrem Ende auf eine Sequenz untersucht, die einen erfolgreichen Einsatz des ARCUT-Systems ermöglicht (Abbildung 94). Bei der Auswahl der Zielsequenzen wurden mehrere Kriterien beachtet: Der AT-Gehalt sollte minimal 40% betragen.⁸⁰ Bei einem zu geringem AT-Gehalt könnte sich ein homo-pcPNA-Komplex ausbilden, da die repulsiven D- U_S -Wechselwirkungen zu schwach ausgeprägt wären. Weiterhin würde durch die fehlenden D-T-Wechselwirkungen die Doppel-Duplex-Invasion der pcPNA-Stränge mit der dsDNA gehemmt. Des Weiteren sollten Sequenzen von vier oder mehr gleichen Basen in den pcPNA-Oligomeren vermieden werden, da diese eine effizienzmindernde Faltung der Stränge induzieren können. In der nicht-kodierenden Region direkt nachfolgend der *psyD*-DNA wurde eine Sequenz gefunden, die den Bedingungen eines erfolgversprechenden Einsatzes des ARCUT-Systems genügen (rot umrandet in Abbildung 94).

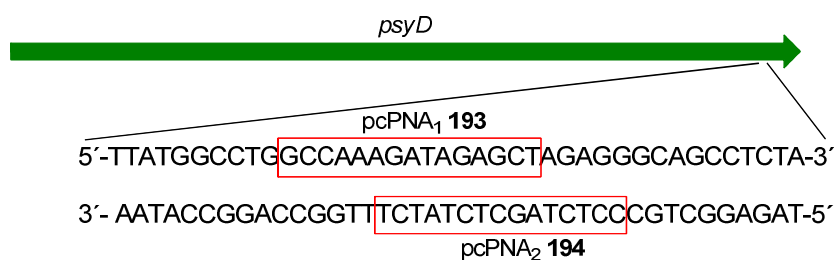


Abbildung 94: Ausschnitt der *psyD*-Gensequenz; rot umrandet: Sequenzen, an denen die pcPNA-Oligomere **193** und **194** binden sollen.

3.4.3 Synthese der pcPNA-Oligomere

Anhand der jeweiligen Zielsequenz im *psyD* wurden die komplementären pcPNA-Oligomere **193**, **194** mittels modifizierter Merrifield-Festphasensynthese ausgehend von den Monomeren **110-113**, **115b**, **118b** hergestellt (Abbildung 95).^{80,88} Um die Bindungsaffinität und die Polarität der pcPNA-Stränge **193**, **194** zu erhöhen, wurden an dem jeweiligen pseudo-3'-Ende zwei Lysinbausteine **55** eingebaut. Zusätzlich wurde an den *N*-Terminus der beiden Oligomere **193**, **194** mit K **55** und Phosphoserin (**56**) gekoppelt. Diese Modifikation sollte die Effizienz des ARCUT-System bei der DNA-Spaltung verbessern.⁸⁰

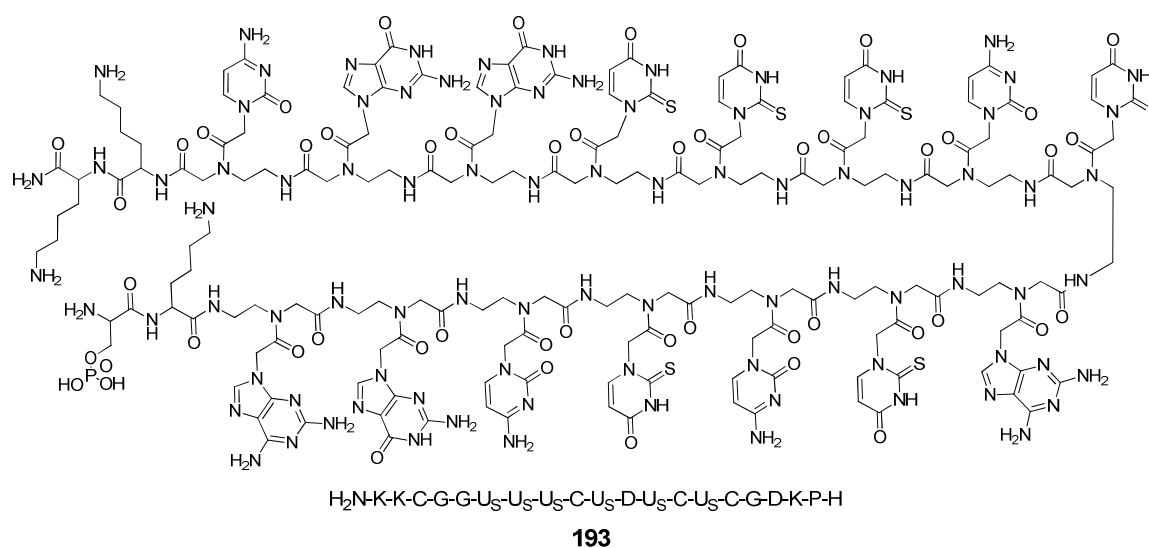


Abbildung 95: Struktur des synthetisierten pcPNA₁-Oligomers **193**.

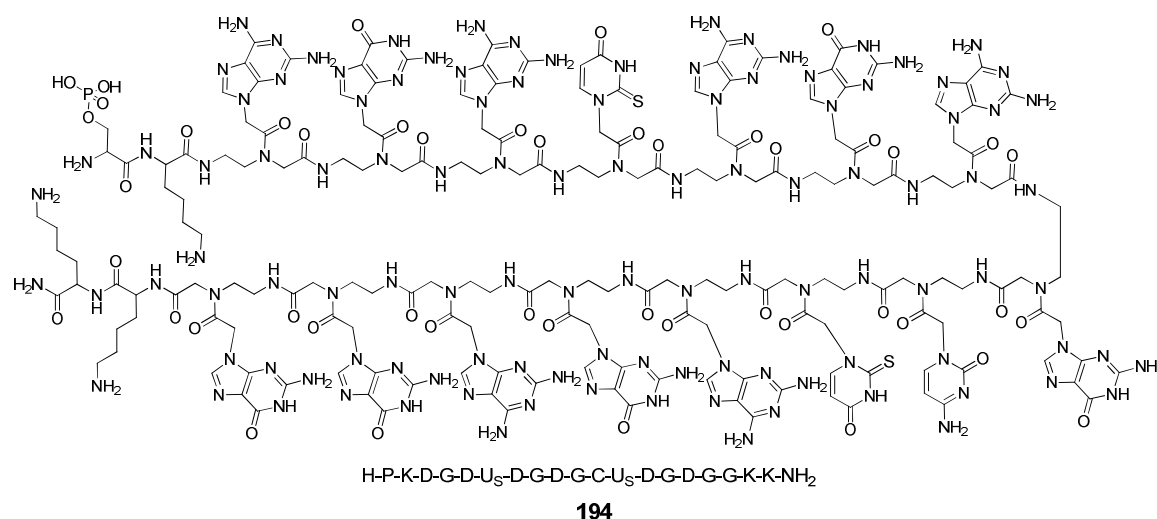


Abbildung 96: Struktur des synthetisierten pcPNA₂-Oligomers **194**.

Nach der mit HBTU initiierten Kupplung der ersten Monomereinheit an das MHBA wurden freie Aminogruppen des Harzes mit Essigsäureanhydrid (Ac₂O) acyliert, sodass unerwünschte Folgekupplungen mit anderen Monomeren unterbunden wurden.

Für die Kettenverlängerung wurde die terminale Aminogruppe säurekatalysiert geschützt und mit Pyridin neutral gewaschen (Abbildung 97). Anschließend wurde der harzgebundene Strang mit einer Lösung aus dem nächsten Baustein und HBTU unter basischen Bedingungen inkubiert. Nach dem Entfernen des Monomerüberschusses wurden potentielle freie Aminogruppen am Oligomer durch die Reaktion mit Rapoport-Reagenz (**192**) als Cbz-Amin blockiert. Die Verlängerungsschritte wurden bis zum Erreichen der gewünschten Sequenz wiederholt. Anschließend wurden säurekatalysiert alle Schutzgruppen am Oligomer entfernt. Unter stark sauren Bedingungen wurde der pcPNA-Strang, unter Derivatisierung zum Amid, vom Harz abgespalten (vgl. Abbildung 34). Durch die Ausfällung aus Diethylether wurde ein Oligomerengemisch erhalten, das mittels Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (LC-MS) analysiert wurde (vgl. Abbildung 287, Abbildung 290 im Anhang). Anschließend wurden die pcPNA-Stränge **193**, **194** per HPLC isoliert.

Für das Oligomer **193** wurde eine Molekülmasse von $m/z = 4634.6$ gemessen. Dies war im Einklang mit der berechneten Masse $m_{194, \text{berechnet}}: 4634.7$ (siehe Abbildung 288, Abbildung 289 im Anhang). Auch die bestimmte Masse von $m/z = 4842.8$ für den pcPNA-Strang **194** stimmte mit der berechneten Masse $m_{195, \text{berechnet}}: 4842.9$ überein (siehe Abbildung 291, Abbildung 292 im Anhang).

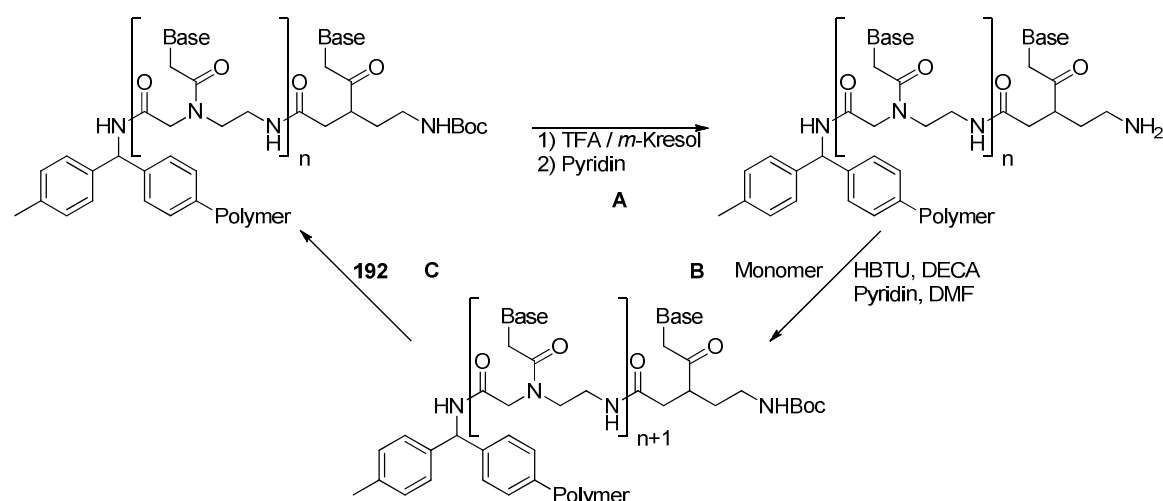


Abbildung 97: Kettenverlängerungsreaktion: **A)** säurekatalysierte Entschützung des N-Terminus, **B)** HBTU-initiierte Verlängerung um einen Monomerbaustein, **C)** Blockierung freier Aminogruppen mit Rapoport-Reagenz (**192**); DECA: *N,N*-Diethylcyclohexylamin.

Fazit: Für die ARCUT-basierte Spaltung dsDNA wurden zunächst die beiden nicht kommerziell erhältlichen Bausteine **115b** und **118b** synthetisiert. Dabei gelang die Synthese des D_M **115b** analog der Literatur in fünf linearen Stufen mit 800 mg (5.84%) Gesamtausbeute. Ebenso in fünf linearen Stufen wurde mit einer Gesamtausbeute von 880 mg (16.80%) das $U_{S,M}$ **118b** dargestellt. Mittels modifizierter Merrifield-Festphasensynthese wurden mit den synthetisierten Monomeren **115b**, **118b** und den kommerziell verfügbaren Bausteinen **110-113** die beiden pcPNA-Oligomere **193**, **194** synthetisiert. Die pcPNA-Stränge **193**, **194** wurden mittels HPLC aufgereinigt und massenspektrometrisch analysiert. In folgenden Arbeiten können die beiden Oligomere **193**, **194** für die gezielte ARCUT-vermittelte Manipulation der psyD-DNA eingesetzt werden. Zudem können in Zukunft mit den zur Verfügung stehenden Monomeren **110-113**, **115b** maßgeschneiderte pcPNA-Stränge synthetisiert werden, die die Verwendung von ARCUT in Arbeiten, bei denen große DNA-Stücke selektiv gespalten werden sollen, erlauben.

3.5 Zusammenfassung und Ausblick

Trans-AT-PKS zeichnen sich neben den freistehenden AT-Domänen auch durch eine ungewöhnliche Modularchitektur und neuartigen Domänen aus. Die Funktion einzelner Domänen, aber auch ganzer Module ist bislang nur schlecht verstanden, wodurch die Forschung mit neu isolierten *trans*-AT-PKS erschwert ist. Eine phylogenetische Analyse der erst seit kurzem bekannten *trans*-AT-PKS zeigte, dass die Gensequenz einer KS-Domäne mit der Struktur des durch diese KS prozessierten Intermediats korreliert. Da

das für *cis*-AT-PKS entwickelte Colinearitätsprinzip bei den *trans*-AT-PKS oft versagt, wird die gefundene Sequenzkorrelation bereits verwendet, um Strukturvorhersagen für Produkte von *trans*-AT-PKS zu ermöglichen. Dadurch wurde die Forschung mit *trans*-AT-Systemen bereits erleichtert, jedoch basiert die gefundene Korrelation auf *In-silico*-Daten. Biochemisch wurde die Substratspezifität in *trans*-AT KS bislang noch nicht verifiziert. Deshalb wurde im Hauptprojekt der vorliegenden Arbeit die Substratspezifität erstmals experimentell untersucht und validiert (vgl. Abschnitt 3.1). Für die Verifikation der Korrelation wurde in Zusammenarbeit mit Annette Kampa, Sarah Frank, Petra Pöplau (alle AG Piel) und der AG Oldham (Nottingham, UK) eine neue *In-vitro*-Methode etabliert, die schnelle und zuverlässige Rückschlüsse auf die Substratspezifität von *trans*-AT KS erlauben. Annette Kampa und Sarah Frank exprimierten im Rahmen ihrer Promotionsarbeiten verschiedene KS-Domänen aus der Psymberin- und Bacillaen-PKS. Entsprechend des vorhergesagten natürlichen Intermediats der exprimierten KS wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Testsubstrate synthetisiert. Dabei wurden sowohl Volllängensubstrate, als auch repräsentative verkürzte Moleküle hergestellt. Passend zur Fragestellung bei den untersuchten KS-Domänen wurden, im Vergleich zur Struktur des natürlichen Intermediats, bei den synthetisierten Substraten Modifikationen in der α,β -Region oder der γ,δ -Position eingebaut, sowie Konfigurationsisomere hergestellt. In Proteinassays wurden die Substrate mit den exprimierten KS inkubiert und die Beladung des Proteins mittels ESI-MS analysiert. Die Inkubationsversuche wurden dabei von der AG Oldham durchgeführt.

Bei dem Proof-of-Principle wurden die erste (KS 1), zweite (KS 2) und dritte KS (KS 3) der Psymberin-PKS und die fünfte KS (KS 5) aus dem Bacillaen-Cluster untersucht (vgl. Abbildung 35, Abschnitt 3.1.1). Hauptaugenmerk lag bei dieser Studie, neben der Kontrolle der Anwendbarkeit der neu entwickelten Methode, auf der Untersuchung der Substratspezifität bezüglich Modifikationen in der α,β -Region im Substrat. Zusätzlich zu den im Rahmen der vorliegenden Arbeit synthetisierten kurzkettigen, enantioreinen β -Hydroxysubstrate **57a, b** wurden von Sarah Frank und Petra Pöplau (beide AG Piel) die verkürzten, repräsentativen Thioester **58-63** für die Assays zur Verfügung gestellt (vgl. Abbildung 36, Abbildung 51). Das Proof-of-Principle bestätigte *in vitro* eine Substratspezifität von *trans*-AT KS gegenüber der α,β -Region im prozessierten Substrat (vgl. Abbildung 53, Tabelle 1). Darüber hinaus bewies die Studie, dass die neu entwickelte Methode zur schnellen und aussagekräftigen Analyse der *trans*-AT KS-Substratspezifität eingesetzt werden kann. Die Ergebnisse zeigten, dass die Spezifität in verschiedenen KS unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Für die Psymberin KS 1 und KS 2 wurden niedrige Spezifitäten nachgewiesen. Alle getesteten Substrate **57a,b,58-63**

wurden von den Proteinen akzeptiert. Hingegen wurden für die Psymberin KS 3 und die Bacillaen KS 5 Präferenzen bezüglich der inkubierten Thioester **57a**, **b**, **58-63** gefunden. Die Thioester **61**, **63** mit Kohlenstoffseitenketten in der β -Position wurden von den Domänen nicht toleriert.

Die erste KS (KS 1) der Bacillaen-PKS prozessiert das Intermediat eines NRPS-Moduls, das Glycin in das Polyketid einbaut (vgl. Abbildung 54, Abschnitt 3.1.2). Für die Studien der Bacillaen KS 1 wurden daher die Volllängensubstrate **64a-c** über Standardverfahren der Peptidsynthese hergestellt, wobei Glycin in **64b** gegen Alanin und in **64c** gegen Valin substituiert wurde. Weiterhin wurden die Thioester **65-68** synthetisiert, mit denen selektiv der Einfluss der verschiedenen Funktionalitäten im natürlichen Substrat untersucht wurde. Ferner wurde das in δ -Position reduzierte Hydroxyanalogon **69** hergestellt, um den Oxidationsgrad der δ -Position zu analysieren. Mit den synthetisierten Substraten **70**, **71** wurde die Akzeptanz von Heteroaromaten getestet, da diese auch als Produkte von NRPS-Module hervorgehen können. Die Proteinassays mit den Thioestern **64a-c** zeigte, dass die KS spezifisch gegenüber sterische Ansprüchen in der eingebauten Aminosäure agiert (vgl. Abbildung 59, Tabelle 2). Das Glycinderivat **64a** wurde bevorzugt akzeptiert. Das Alaninanalogon **64b** acylierte das Protein nur etwa halb so schnell wie **64a**, bei dem Valin-substituierten Thioester **64c** wurde keine Acylierung innerhalb des Beobachtungszeitraums detektiert. Die Substrate **70**, **71** wurden im Vergleich zum Referenzsubstrat **64a** um den Faktor 10 langsamer prozessiert, auch hier scheint die Sterik oder die reduzierte Flexibilität der Substrate **70**, **71** die Acylierung zu hemmen. Im Vergleich der Substrate **65-68** wurde nur bei dem *N*-Ethylglycinthioester **65** eine Acylierung der Domäne detektiert. Daraus lässt sich folgern, dass die NH-Gruppe im natürlichen Intermediat entscheidend die Acylierung beeinflusst. Eine phylogenetische Analyse der Aminosäuren-prozessierenden KS von Matthew Jenner (AG Oldham) ließ vermuten, dass Wechselwirkungen zwischen der NH-Gruppe des Intermediats mit dem neben dem aktivierten Cystein lokalisierten Asparagin Auswirkungen auf die Substratspezifität der KS 1 haben. Die Hypothese wurde durch die Analyse mit einer Mutante (Matthew Jenner), bei der Asparagin gegen Alanin ersetzt wurde, untermauert. Das Glycinsubstrat **64a** acylierte die Mutante um etwa 70% langsamer im Vergleich zur natürlichen KS. Der Vergleich der Acylierungsraten des δ -Ketosubstrats **64a** und des δ -Hydroxysubstrats **69** ergab keine neuen Erkenntnisse zum Oxidationsgrad der δ -Position.

Anhand der Analyse der zweiten KS (KS 2) der Bacillaen-PKS wurde der Einfluss der γ,δ -Position auf die Substratspezifität von KS untersucht (vgl. Abschnitt 3.1.3). Für die

Studie wurde über Standardverfahren der Peptidkupplung das Volllängensubstrat **72** als Referenz synthetisiert. Mit einer Johnson-Orthoester-Umlagerung als Schlüsselschritt in einer drei Stufen Synthesesequenz wurde der γ,δ -ungesättigte Thioester **73** hergestellt. Mittels Wittig-Olefinierung und anschließender Hydrierung der Doppelbindung wurde in insgesamt fünf Syntheseschritten das δ -Methoxysubstrat **74** synthetisiert. Die Proteinassays mit den Thioestern **73**, **74** und den aus der KS 1-Studie verfügbaren Substraten **67**, **68** wurde gezeigt, dass die Substratspezifität distal der β -Position signifikant relaxiert (vgl. Abbildung 66, Tabelle 3). Alle inkubierten Thioester **67**, **68**, **73**, **74** wurden in vergleichbaren Raten von der KS 2 akzeptiert. Unerwarteterweise wurde bei dem Volllängensubstrat **72** keine Acylierung beobachtet. Vermutlich verhindern eine Substratdimerisierung oder komplexgebundenen Metalle am Substrat **72** die Acylierung. Mit dem kurzkettigen β -Methoxythioester **75** und den Substraten **59**, **62** wurde bestätigt, dass auch die KS 2 bis zur β -Position spezifisch agiert. Während sowohl das Butyrylsubstrat **59**, als auch der β -Thioester **62** akzeptiert wurden, wurde bei Substrat **75** keine Acylierung beobachtet.

Die vierte KS (KS 4) in der Bacillaen-PKS prozessiert in der Biosynthese ein *cis*-konfiguriertes, α,β -ungesättigtes Intermediat (vgl. Abbildung 68). Für die Untersuchung der KS 4 Substratspezifität wurden die vier Volllängen-Substrate **76-79** synthetisiert (Abschnitt 3.1.4). Schlüsselreaktion für die *cis*-konfigurierten Substrate **76**, **78**, **79** war die Still-Gennari-Olefinierung, die *trans*-Doppelbindung im Substrat **77** wurde mittels Wittig-Olefinierung installiert. Das, die biosynthetische Zwischenstufe imitierende, Substrat **76** wurde in acht linearen Stufen mit einer Gesamtausbeute von 130 mg (3.32%) dargestellt. Das *trans*-konfigurierte Analogon **77** wurde mit einer Gesamtausbeute von 20 mg (4.25%) in acht Synthesestufen erhalten. Die Synthese des *cis*-konfigurierten γ -Methylthioesters **77** gelang in zehn Stufen mit einer Gesamtausbeute von 130 mg (2.36%). Das δ -Methoxyanalogon **78** wurde in einer 11-Stufensequenz mit 60 mg (0.76%) Gesamtausbeute für die Analyse der KS 4 Substratspezifität zur Verfügung gestellt. Bisher wurde die KS 4 noch nicht erfolgreich exprimiert, so dass in Folgearbeiten nach erfolgreicher Proteinproduktion die Substrattoleranz der KS 4 untersucht werden kann. Dies würde erste Ergebnisse über eine *trans*-AT KS liefern, die ein ungesättigtes Biosyntheseintermediat prozessiert.

Insgesamt wurde im Hauptprojekt erstmals *in vitro* eine Substratspezifität in *trans*-AT KS nachgewiesen. Es wurde gezeigt, dass die Spezifität in allen untersuchten KS bis zur β -Position unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Darüber hinaus belegten die Ergebnisse, dass die Substrattoleranz ab der γ -Position signifikant relaxiert. Aufbauend auf die Ergebnisse sollte es in Zukunft einfacher sein, neue *trans*-AT Gencluster zu analysieren

und maßzuschneidern. In Hinblick auf die kombinatorische Biosynthese mit *trans*-AT-PKS wurde gezeigt, dass beim Austausch von Modulen, die zum neuen Modul passende KS mit ersetzt werden muss (vgl. Abbildung 85).

Eine Studie zur Biosynthese des Misakinolid A (**24**) ergab, dass in Modul 15 eine putative Pyransynthase (PS) integriert ist (vgl. Abbildung 13).³¹ Auch in anderen *trans*-AT-Clustern, wie bei der Biosynthese des Psymberins (**47**), wurden PS entdeckt (vgl. Abbildung 26). Für PS wurde eine Ringschlussreaktion durch intramolekulare Addition der ζ -Hydroxygruppe an der β -Position als katalytische Funktion postuliert.²⁵ Ein funktioneller Nachweis für die vorhergesagte Funktion wurde bisher aber noch nicht erbracht. Deshalb untersucht Petra Pöplau (AG Piel) im Rahmen ihrer Promotionsarbeit die katalytische Aktivität von PS *in vitro*. Für die Inkubationsversuche mit exprimierten PS aus der Psymberin- und Misakinolid-PKS wurden im Rahmen dieser Arbeit die beiden Substrate **90**, **91** zur Verfügung gestellt (Abschnitt 3.2). Der offenkettige Thioester **91** wurde dabei in acht linearen Stufen mit einer Gesamtausbeute von 40 mg (2.38%) synthetisiert. In elf linearen Syntheseschritten gelang die Synthese des zyklischen Substrats **90** mit einer Gesamtausbeute von 150 mg (2.73%). Bislang wurden die Proteinassays mit den synthetisierten Substraten **90**, **91** noch nicht durchgeführt, so dass in Folgearbeiten die Thioester **90**, **91** für den funktionalen Nachweis der Pyranbiosynthese durch PS eingesetzt werden können.

In das NRPS-Peptid Hormaomycin (**32**) ist mit *cis*-(*Z*)-Propenylprolin eine bislang in der Natur einzigartige Aminosäure eingebaut (Abbildung 21). Xiaofeng Cai (AG Piel) und Dr. Max Crüsemann (AG Piel) befassten sich im Rahmen ihrer Promotionsarbeiten mit der NRPS-Biosynthese des Hormaomycins (**32**).^{53,161} Der Fokus in den Arbeiten von Xiaofeng Cai lag dabei auf der Analyse von, in der Hormaomycin-Biosynthese involvierten, Genen, deren Funktion bislang nicht eindeutig geklärt ist. Dr. Max Crüsemann untersuchte unter anderem die Substratspezifität der A-Domänen im Hormaomycin (**32**). Für beide Studien wurde im Rahmen dieser Promotion *cis*-(*Z*)-Propenylprolin Hydrochlorid (**109**) analog der Literatur in neun linearen Stufen mit einer Gesamtausbeute von 30 mg (9.05%) synthetisiert (vgl. Abbildung 89, Abschnitt 3.3).^{48,92} In Fütterungsexperimenten mit dem synthetisierten Prolin **109** an Knock-Out-Mutanten wurde von Xiaofeng gezeigt, dass das Gen *hrmD* in der Biosynthese des Prolinbausteins involviert ist. Weiterhin belegte die Verfütterung des Prolins **109** an eine *hrmH*-deletierte Mutante, dass *hrmH* ein Regulatorgen für die Prolinbiosynthese ist. Dr. Max Crüsemann demonstrierte in Inkubationsversuchen mit exprimierten A-Domänen und dem synthetisierten Prolin **109**, dass der Prolinbaustein sehr spezifisch von der korrespondierenden A-Domäne erkannt und prozessiert wird.

Das antikanzerogen-wirkende *trans*-AT Polyketid Psymberin (**47**) wird von einem symbiontischen Bakterium im Schwamm *Psammocinia* aff. *bulbosa* in sehr geringen Mengen produziert, das Bakterium ist unter den aktuell verfügbaren Technik unter Laborbedingungen jedoch nicht kultivierbar.^{68,69,72} Dr. Cristian Gurgui (AG Piel) assemblierte in vorangegangenen Arbeiten alle in der Biosynthese des Polyketids **47** involvierten Gene auf einem Plasmid. Nach der heterologen Expression des Plasmid in *E. coli* und Kultivierung des neuen Produzenten wurde bislang aber noch keine Psymberinproduktion detektiert. In einer aktuellen Studie sollte deshalb das GFP-Reportergen hinter *psyD* in das Plasmid eingebaut werden. *PsyD* kodiert zusammen mit *psyA* die Biosynthese des Polyketidgrundgerüsts. Nach der Ligation des GFP-Gens sollte das modifizierte Plasmid wiederum heterolog exprimiert werden. GFP fluoresziert nur bei korrekter Faltung des Proteins, so dass anhand der Fluoreszenzintensität die Kultivierungsbedingungen zu einer maximalen Proteinproduktion optimiert werden können.⁹³ Dies könnte in einer gesteigerten Psymberinproduktion resultieren. Die Ligation des GFP-Reportergens hinter *psyD* erfordert allerdings eine spezifische dsDNA-Spaltung, die mittels der Selektivität kommerziell verfügbarer Restriktionsenzymen nicht erreicht wird. Das in der Literatur beschriebene ARCUT-System bietet die Möglichkeit einer hochselektiven dsDNA-Spaltung an einer definierten Stelle. Daher wurden im letzten Teil der Arbeit die pcPNA-Oligomere **193**, **194** als Kernkomponenten für die ARCUT-basierte dsDNA-Spaltung zur Verfügung gestellt (Abschnitt 3.4). Dafür wurden zunächst die beiden nicht kommerziell erhältlichen Monomere **115b**, **119b** jeweils in linearen 5-Stufensynthesen analog der Literatur dargestellt.⁸⁸ Das D_M**115b** wurde mit einer Gesamtausbeute von 800 mg (5.84%) und das U_{S,M}**118b** mit einer Gesamtausbeute von 880 mg (16.80%) erhalten. Zusammen mit den kommerziell verfügbaren Bausteinen **110-113** wurden mit den Monomeren **115b**, **118b** mittels modifizierter Festphasensynthese die Oligomere **193**, **193** synthetisiert. In folgearbeiten ist nun möglich das Plasmid selektiv am Ende der *psyD* Gensequenz zu spalten. Anschließend kann durch Ligation das GFP-Reportergen eingebracht werden. Außerdem können mit den bereitgestellten Monomeren maßgeschneiderte pcPNA-Stränge hergestellt werden, die die ARCUT-basierte, spezifische Manipulation großer DNA-Fragmente in Zukunft erlauben.

4 Experimenteller Teil

4.1 Material und Methoden

4.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Alle kommerziell erworbenen Chemikalien wurden im Allgemeinen ohne weitere Aufreinigung verwendet, andernfalls wurde die Aufreinigung zu Beginn der entsprechenden Synthese beschrieben. Alle Chemikalien wurden von folgenden Herstellern bezogen: Alfa Aesar (Karlsruhe), Acros Organics (Nidderau), ASM Research Chemicals (Hannover), Sigma Aldrich (Taufkirchen), TCI (Eschborn), Carbolution (Saarbrücken) und VWR (Darmstadt).

Die Reinigung und Trocknung der Lösungsmittel erfolgte nach gängigen Methoden.¹⁶⁴

4.1.2 Kernresonanzspektroskopie

¹H-NMR: Bruker DP300 (300 MHz), Bruker DP400 (400 MHz) und Bruker DRX 500 (500 MHz). Alle Spektren wurden bei Raumtemperatur aufgenommen. Die Verschiebungen δ sind in parts per million [ppm] angegeben und beziehen sich auf das nicht vollständig deuterierte Lösungsmittel, das als interner Standard dient: CHCl_3 ($\delta = 7.26$ ppm), DMSO ($\delta = 2.50$ ppm), MeOH ($\delta = 3.31$ ppm), H_2O ($\delta = 4.79$ ppm).¹⁶⁵ Charakterisierung der Signal-aufspaltung: s = Singulett, d = Duplett, t = Triplett, q = Quartett, h = Heptett, m = Multiplett, br = verbreitertes Signal. Die Spektren wurden nach 1. Ordnung ausgewertet. Alle Kopplungskonstanten J werden in Hertz [Hz] angegeben und sind Betragswerte. Die Zuordnung der Signale erfolgt entsprechend den Nummerierungen der angegebenen Skizze.

¹³C-NMR: Bruker DP300 (75 MHz), Bruker DP400 (100 MHz). Alle Spektren wurden bei Raumtemperatur aufgenommen. Alle Verschiebungen δ sind in parts per million [ppm] angegeben und beziehen sich auf das deuterierte Lösungsmittel, das als interner Standard dient: CDCl_3 ($\delta = 77.16$ ppm), d_6 -DMSO ($\delta = 39.52$ ppm), MeOD ($\delta = 49.00$).¹⁶⁵ Die Zuordnung der Signale erfolgt entsprechend den Nummerierungen der angegebenen Skizze.

4.1.3 Massenspektrometrie

Die Massenspektren von synthetisierten Verbindungen wurden von Frau Sondag und Frau Dr. Engeser am *Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie* der Universität Bonn aufgenommen. Für die Elektrosprayionisation-Spektren (ESI) und die

High-Resolution-MS-Spektren (HRMS) wurde ein Bruker micrOTOF-Q Flugzeitspektrometer verwendet.

Die Massenspektren der Proteinassays wurden von Matthew Jenner an der Universität von Nottingham (UK) aufgenommen. Für die nanoESI-Spektren wurde ein Waters SYNAPTTMHDMSTM verwendet. Die Daten wurden mit dem Programm MassLynxTM 4.1 analysiert.

4.1.4 Infrarotspektroskopie

Die IR-Spektren wurden mit einem FT-IR-ATR-Spektrometer Nicolet 380 der Firma Thermo aufgenommen. Die Angabe der Wellenzahlen erfolgte in gerundeten, ganzen Zahlen.

4.1.5 Dünnschichtchromatographie

Als stationäre Phase dienten mit Kieselgel beschichtete Aluminiumplatten (Merck, Kieselgel 60 F₂₅₄). Als Anfärbereagenzien wurden Seebach-Reagenz (2.50 g Molybdatophorsäure, 5.00 g Cer(IV)sulfat Tetrahydrat, 16 mL konz. Schwefelsäure, 450 mL Wasser), Kaliumpermanganat-Reagenz (2.00 g Kaliumpermanganat, 20.00 g Kaliumcarbonat, 0.25 g Natriumhydroxid, 300 mL Wasser) und Ninhydrin-Reagenz (0.2% Ninhydrin in Ethanol) verwendet.¹⁵⁸ Die Entwicklungen erfolgten bei 250 °C im Heißluftstrom.

4.1.6 Säulenchromatographie

Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel der Firma Merck (Korngröße 0.040 – 0.063 mm, 230 – 400 mesh, ASTM) verwendet. Die jeweils verwendeten Eluentengemische wurden in den entsprechenden Synthesevorschriften vermerkt.

4.1.7 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Die HPLC-Messungen wurden von Herrn Schneider am *Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie* der Universität Bonn aufgenommen. Die HPLC-Reinigungen wurden mittels eines Knauer Eurospher II 100-5 C18-Systems (5 µm; 4.00 mm x 250 mm mit integrierter Vorsäule) durchgeführt. Die Detektion erfolgte über einen eingebauten Photodiodenarraydetektor bei 190-600 nm Wellenlänge. Die Bedingungen für die HPLC-Aufreinigung wurden bei den entsprechenden Synthesevorschriften vermerkt.

4.1.8 HPLC-HRMS

Die HPLC-HRMS-Messungen wurden von Frau Peters-Pflaumbaum am *Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie* der Universität Bonn aufgenommen. Für die

HPLC-massenspektrometrischen Untersuchungen (HPLC-HRMS) war ein microQO-TOF-Flugzeitspektrometer der Fa. Bruker Daltonik GmbH (Bremen) mit Apollo-ESI-Quelle mit einer HPLC-Anlage Agilent-1200-Serie gekoppelt. Das System wurde mit der HyStar Software (Bruker) gesteuert. Die Kalibrierung erfolgte intern mit Natriumformiat. Die Genauigkeit der Massenbestimmung lag bei 5 ppm (exakte Masse). Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software Data Analysis der Firma Bruker. Die verwendeten HPLC-Methoden wurden in der entsprechenden Synthesevorschrift vermerkt.

4.1.9 Allgemeine Arbeitsmethoden

Alle Reaktionen mit sauerstoff- oder feuchtigkeitsempfindlichen Reagenzien wurden in, unter Vakuum ausgeheizten und mit Argon gespülten, Reaktionsgefäßen durchgeführt. Absolutierte Lösungsmittel und flüssige Substanzen wurden über Plastikspritzen zugegeben, die gegebenenfalls zuvor mit Argon geflutet wurden.

4.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

4.2.1 AAV 1: Amidknüpfung mit EDC-HCl und HOBt als Kupplungsreagenzien⁶⁴

Zu einer Lösung aus der Säure (1.0 eq.) in wasserfreiem Tetrahydrofuran (THF) oder CH_2Cl_2 wurden bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre EDC-HCl (1.2 eq) und HOBt (1.2 eq.) zugegeben und die Reaktionslösung wurde für 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde eine Lösung aus dem Amin (1.2 eq.) in THF oder CH_2Cl_2 und katalytische Mengen an 4-Dimethylaminopyridin (4-DMAP) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur (r.t.) gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Essigsäureethylester (EtOAc) verdünnt und mit gesättigter wässriger NH_4Cl -Lösung, gesättigter, wässriger NaHCO_3 -Lösung und gesättigter wässriger NaCl -Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Na_2SO_4 wurde das Lösemittel (LM) unter vermindertem Druck entfernt. Durch säulenchromatographische Aufreinigung an SiO_2 wurde das Amid erhalten.

4.2.2 AAV 2: Basenkatalysierte Entschützung von Estern¹⁰⁷

Zu einer Lösung aus dem Ester (1.0 eq) in THF/ Methanol (MeOH)/ H_2O (2:2:1, v/v/v) wurde LiOH (25 eq.) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Nach dem Entfernen der organischen LM unter vermindertem Druck wurde die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit NaHSO_4 ($c \approx 0.1 \text{ M}$ in H_2O) auf $\text{pH} = 2$ angesäuert und mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger NaCl -Lösung extrahiert und über Na_2SO_4

getrocknet. Nach dem Entfernen des LM unter vermindertem Druck wurde das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an SiO₂ aufgereinigt.

4.2.3 AAV 3: Synthese der SNAC-Thioester mit EDC-HCl und HOBt als Kupplungsreagenzien¹⁰⁴

Zu einer Lösung aus der Säure (1.0 eq.) in absolutem CH₂Cl₂ wurde bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre EDC-HCl (1.2 eq.) und HOBt (1.2 e.q.) zugegeben und die Reaktionslösung wurde 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde *N*-Acetylcysteamin (1.2 eq.) und katalytische Mengen an 4-DMAP zugegeben. Nach dem Rühren der Lösung über Nacht bei r.t. wurde gesättigte wässrige NH₄Cl-Lösung zugegeben und die Phasen wurden separiert. Die wässrige Phase wurde mit CH₂Cl₂ extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über Na₂SO₄ wurde das LM unter vermindertem Druck abdestilliert und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an SiO₂ aufgereinigt.

4.2.4 AAV 4: Synthese der SNAC-Thioester mit CDI als Kupplungsreagenz⁹⁸

Carbonyldiimidazol (CDI) (1.2 eq) wurde zu einer Lösung aus der Säure (1.0 eq.) in absolutem THF oder CH₂Cl₂ unter Ar-Atmosphäre bei r.t. zugegeben. Nach 10 min Rühren wurde *N*-Acetylcysteamin (1.2 eq.) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Das LM wurde unter vermindertem Druck abdestilliert, und der Rückstand wurde in EtOAc gelöst. Die organische Phase wurde mit Wasser gewaschen und anschließend über Na₂SO₄ getrocknet. Das LM wurde unter vermindertem Druck abdestilliert, und das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an SiO₂ aufgereinigt.

4.2.5 AAV 5: Synthese *cis*-konfigurierten, α,β -ungesättigten Estern mittels Still-Gennari-Olefinierung¹¹⁴

Zu einer Lösung aus dem Ethyl- oder Methyl-[*O,O'*-bis-(2,2,2-trifluorethyl)-phosphonoacetat] (**149a,b**) (1.50 eq.) und [18]Krone-6 (**150**) (5.20 eq.) in absolutem THF wurde bei -78 °C unter Ar-Atmosphäre KHMDs (1.48 eq.) tropfenweise zugegeben, und die Reaktionslösung wurde für 30 min bei 0 °C gerührt. Nach dem Abkühlen der Reaktionslösung auf -78 °C wurde eine Lösung aus dem Aldehyden (1.00 eq.) in THF langsam zugegeben. Die Lösung wurde über Nacht unter langsamen Erwärmen auf r.t. gerührt. Nach Zugabe von gesättigter wässriger NH₄Cl-Lösung wurde die Reaktionsmischung mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach

dem Entfernen des LM unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch an SiO₂ aufgereinigt.

4.2.6 AAV 6: Palladium-katalysierte Entschützung von Benzylestern⁹⁷

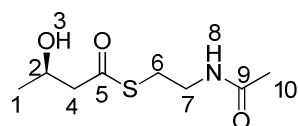
Eine Suspension aus dem Benzylester (1.0 eq) und Pd (0.1 eq., 10% aktiviert auf Kohlenstoff) in Methanol wurde über Nacht unter H₂-Atmosphäre (1 bar) gerührt. Anschließend wurde die Suspension durch Celite® 545 filtriert, und der Filterkuchen wurde mit EtOAc gewaschen. Durch Entfernen der LM der vereinigten organischen Fraktionen wurde die Säure erhalten und ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

4.3 Synthesevorschriften

4.3.1 Substrate für das Proof-of-Principle

4.3.1.1 (R)-S-(2-Acetamidoethyl) 3-hydroxybutanethioat (57a) [CK 217]⁹⁵

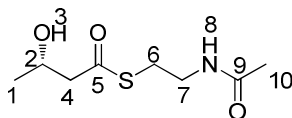
Zu einer Lösung aus (S)-3-Hydroxybuttersäure (**119a**) (0.50 g, 4.80 mmol) in absolutem THF (10 mL) bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre wurde DCC (1.09 g, 5.26 mmol) und katalytische Mengen an 4-DMAP zugegeben. Nach dem Rühren bei 0 °C für 15 min wurde N-Acetylcysteamin (**120**) (1.14 mL, 9.60 mmol) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Der entstandene weiße Feststoff wurde abfiltriert und das Filtrat wurde mit HCl (3 x 5 mL, c = 0.1 M in H₂O) gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit CH₂Cl₂ (3 x 5 mL) und EtOAc (2 x 5 mL) extrahiert. Nach dem Trocknen der vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ wurden die LM unter vermindertem Druck abdestilliert. Durch Aufreinigung des Rohprodukts mittels Säulenchromatographie (SiO₂, EtOAc/ CH₂Cl₂, 2/1, v/v, R_F = 0.2) wurde der Thioester **57a** (0.41 g, 42%) als weißer, wachsartiger Feststoff erhalten; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ=1.23 (d, ³J= 6.5 Hz, 3H, H-1), 1.96 (s, 3H, H-10), 2.69 – 2.73 (m, 2H, H-4), 3.04 (t, ³J=6.3 Hz, 2H, H-6), 3.44 (dt, ³J= 6.3 Hz, ³J= 6.0 Hz, 2H, H-7), 4.20 – 4.28 (m, 1H, H-2), 5.99 (br s, 1H, H-8).



4.3.1.2 (S)-S-(2-Acetamidoethyl) 3-hydroxybutanethioat (57b) [CK 218]⁹⁵

Der Thioester **57b** (0.44 g, 45%) wurde ausgehend von der Säure **119a** analog der Synthese beschrieben in 4.3.1.1 durchgeführt; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 1.21 (t, ³J= 6.0 HZ, 3H, H-1), 1.94 (s, 3H, H-10), 2.68 – 2.72 (m, 2H, H-4), 3.01 (t, ³J= 6.3 Hz,

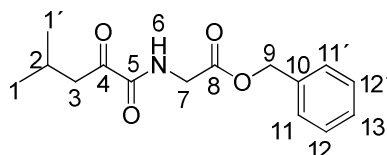
2H, H-6), 3.41 (dt, $^3J = 6.3$ Hz, $^3J = 6.0$ Hz, 2H, H-7), 4.18 – 4.28 (m, 1H, H-2), 6.12 (br s, 1H, H-8).



4.3.2 Substrate zur Analyse der Bacillaen KS 1 Substratspezifität

4.3.2.1 2-(4-Methyl-2-oxopentanamido)-essigsäurebenzylester (123a) [CK 132]⁹⁶

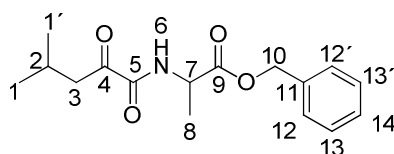
Analog zu AAV 1 wurde zu einer Lösung aus der Säure **121** (1.00 g, 7.68 mmol) in absolutem THF (45 mL) bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre EDC-HCl (1.77 g, 9.23 mmol) und HOBt (1.25 g, 9.23 mmol) zugeben, und die Reaktionslösung wurde für 30 min bei 0 °C gerührt. Abweichend von der AAV wurde *N*-Methylmorpholin (2.5 mL, 22.74 mmol) anstelle von 4-DMAP zugetropft, anschließend wurde Glycinbenzylester Hydrochlorid (**122a**) (1.86 g, 9.23 mmol) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt und mit EtOAc (100 mL) verdünnt. Die organische Phase wurde mit gesättigter wässriger NH₄Cl-Lösung (3 x 20 mL), gesättigter wässriger NaHCO₃-Lsg (3 x 20 mL) und gesättigter wässriger NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Na₂SO₄ wurde die LM unter vermindertem Druck abdestilliert. Durch Aufreinigung des Rohprodukts mittels Säulenchromatographie (SiO₂, EtOAc/*o*-Hexan, 1/3, v/v, R_f = 0.50) wurde der Benzylester **123a** (1.67 g, 78%) als farbloses Öl erhalten; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.95 (d, $^3J = 6.8$ Hz, 6H, H-1, H-1'), 2.18 (th, $^3J = 6.8$ Hz, $^3J = 6.8$ Hz, 1H, H-2), 2.89 (d, $^3J = 6.8$ Hz, 2H, H-3), 4.11 (d, $^3J = 5.8$ Hz, 2H, H-7), 5.20 (s, 2H, H-9), 7.33-7.40 (m, 6H, H-6, H-11, H-11', H-12, H-12', H-13); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 22.6 (C-1, C-1'), 24.5 (C-2), 41.2 (C-3), 45.4 (C-7), 67.6 (C-9), 128.6 (C-11*, C-11'*), 128.79 (C-13*), 128.83 (C-12*, C-12'*), 136.1 (C-10), 160.5 (C-5), 168.9 (C-8), 197.9 (C-4); MS (ESI, 10 eV, *m/z* (%)): 300.1 (96) [M+Na]⁺, HR-MS (ESI, 10 eV, *m/z*): C₁₅H₁₉NO₄Na 300.1206 [M+Na]⁺; gemessen: 300.1201 [M+Na]⁺; IR: ν_{max} = 6970, 1151, 1191, 1680, 1721, 1747, 2356, 2958, 3367 cm⁻¹. * Zuordnung nicht gesichert.



4.3.2.2 2-(4-Methyl-2-oxopentanamido)-propansäurebenzylester (123b) [CK 128]⁹⁶

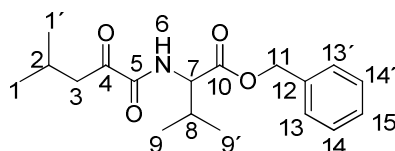
Der Benzylester **123b** wurde ausgehend von Alaninbenzylester *p*-Toluolsulfonat (**122b**) (2.97 g, 9.23 mmol) und 4-Methyl-2-oxopentansäure (**121**) (1.00 g,

7.69 mmol) entsprechend der Synthese beschrieben in 4.3.1.5 synthetisiert. Aufreinigung mittels Säulenchromatographie (SiO₂, EtOAc/ *c*-Hexan, 2/5, v/v, R_f= 0.72) ergab das Produkt **123b** (1.19 g, 53%) als farbloses Öl; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 0.95 (d, ³J= 6.6 Hz, 6H, H-1, H-1'), 1.46 (d, ³J= 7.2 Hz, 3H, H-8), 2.17 (th, ³J= 6.6 Hz, ³J= 6.6 Hz, 1H, H-2), 2.78 (d, ³J= 6.6 Hz, 2H, H-3), 4.58 (dq, ³J= 7.2 Hz, ³J= 7.7 Hz, 1H, H-7), 5.10 (d, ²J= 12.5 Hz, 1H, H-10_a), 5.14 (d, ²J= 12.5 Hz, 1H, H-10_b), 7.30-7.40 (m, 5H, H-12, H-12', H-13, H-13', H-14), 7.43 (br d, ³J= 7.70, 1H, H-6); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ= 18.2 (C-8), 22.6 (C-1*), 22.7 (C-1''), 24.5 (C-2), 45.3 (C-3), 48.3 (C-7), 67.5 (C-10), 128.3 (C-12*, C-12''), 128.7 (C-14), 128.8 (C-13*, C-13''), 135.3 (C-11), 159.8 (C-5), 171.9 (C-9), 198.2 (C-4); MS (ESI, 10 eV, *m/z* (%)): 314.1 (100) [M+Na]⁺, HR-MS (ESI, 10 eV, *m/z*): C₁₆H₂₁NO₄Na 314.1363 [M+Na]⁺; gemessen: 314.1353 [M+Na]⁺; IR: ν_{max}= 668, 1116, 1683, 1742, 2341, 2956 cm⁻¹. * Zuordnung nicht gesichert



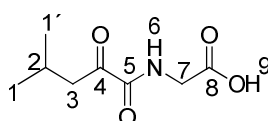
4.3.2.3 3-Methyl-2-(4-methyl-2-oxopentanamido)-butansäurebenzylester (123c) [CK 129]⁹⁶

Der Benzylester **123c** wurde ausgehend von Valinbenzylester *p*-Toluolsulfonat (**122c**) (3.50 g, 9.23 mmol) und 4-Methyl-2-oxopentansäure (**121**) (1.00 g, 7.69 mmol) entsprechend der Synthese beschrieben in 4.3.1.5 synthetisiert. Aufreinigung mittels Säulenchromatographie (SiO₂, EtOAc/ *c*-Hexan, 1/3, v/v, R_f= 0.59) ergab das Produkt **123c** (1.19 g, 53%) als farbloses Öl; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 0.88 (d, ³J= 6.9 Hz, 3H, H-9*), 0.92 (d, ³J= 6.9 Hz, 3H, H-9''), 0.94 (d, ³J= 6.6 Hz, 3H, H-1*), 0.95 (d, ³J= 6.6 Hz, 3H, H-1''), 2.17 (th, ³J= 6.6 Hz, ³J= 6.6 Hz, 1H, H-2), 2.24 (dh, ³J= 6.9, ³J= 4.9 Hz, 1H, H-8), 2.78 (d, ³J= 6.6 Hz, 2H, H-3), 4.51 (dd, ³J= 9.9 Hz, ³J= 4.9 Hz, 1H, H-7), 5.14 (d, ²J= 12.2 Hz, 1H, H-11_a), 5.21 (d, ²J= 12.2 Hz, 1H, H-11_b), 7.30 – 7.40 (m, 6H, H-6, H-13, H-13', H-14, H-14', H-15); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ= 17.7 (C-9*), 19.1 (C-9''), 22.62 (C-1*), 22.63 (C-1''), 24.5 (C-2), 31.5 (C-8), 45.4 (C-3), 57.3 (C-7), 67.3 (C-10), 128.5 (C-13*, C-13''), 128.6 (C-15), 128.7 (C-14*, C-14''), 135.3 (C-12), 160.2 (C-5), 170.9 (C-10), 198.2 (C-4); MS (ESI, 10 eV, *m/z* (%)): 342.2 (50) [M+Na]⁺, HR-MS (ESI, 10 eV, *m/z*): C₁₈H₂₅NO₄Na 342.1676 [M+Na]⁺; gemessen: 342.1667 [M+Na]⁺; IR: ν_{max}= 697, 1148, 1513, 1683, 1739, 2357, 2961 cm⁻¹. * Zuordnung nicht gesichert.



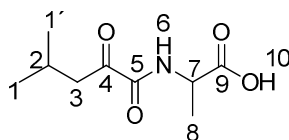
4.3.2.4 2-(4-Methyl-2-oxopentanamido)-essigsäure (**124a**) [CK 122]⁹⁷

Analog zu AAV 6 wurde eine Suspension aus dem Benzylester **123a** (0.40 g, 1.44 mmol) und Palladium (0.04 g, 10% aktiviert auf Kohlenstoff) in absolutem Methanol (4 mL) über Nacht unter H₂-Atmosphäre (1 bar) bei r.t. gerührt. Die Suspension wurde durch Celite® 545 filtriert, und der Filterkuchen wurde mit EtOAc (20 mL) gespült. Durch Entfernen der LM der vereinigten organischen Phasen unter vermindertem Druck wurde die Säure **124a** (0.27 g, quant.) als farbloses Öl erhalten; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 0.94 (d, ³J= 6.7 Hz, 6H, H-1, H-1'), 2.16 (th, ³J= 6.7 Hz, ³J= 6.7 Hz, 1H, H-2), 2.78 (d, ³J= 6.7 Hz, 2H, H-3), 4.09 (s, 2H, H-7), 7.55 (br s, 1H, H-6); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ= 22.6 (C-1, C-1'), 24.4 (C-2), 41.0 (C-3), 45.4 (C-7), 160.7 (C-5), 172.9 (C-8), 197.9 (C-4); MS (ESI, 10 eV, *m/z* (%)): 186.1 (72) [M-H]⁻, HR-MS (ESI, 10 eV, *m/z*): C₈H₁₂NO₄ 186.0761 [M-H]⁻; gemessen: 186.0763 [M-H]⁻; IR: ν_{max}= 669, 1212, 1680, 1747, 2339, 2356, 2957, 3350 cm⁻¹.



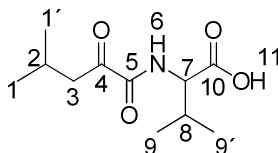
4.3.2.5 2-(4-Methyl-2-oxopentanamido)-propansäure (**124b**) [130]⁹⁷

Analog zu AAV 6 wurde eine Suspension aus dem Benzylester **123b** (1.19 g, 4.08 mmol) und Palladium (0.12 g, 10% aktiviert auf Kohlenstoff) in absolutem Methanol (12 mL) über Nacht unter H₂-Atmosphäre (1 bar) bei r.t. gerührt. Die Suspension wurde durch Celite® 545 filtriert, und der Filterkuchen wurde mit EtOAc (20 mL) gespült. Durch Entfernen der LM der vereinigten organischen Phasen unter vermindertem Druck wurde die Säure **124b** (0.74 g, 90%) als farbloses Öl erhalten; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 0.95 (d, ³J= 6.8, 6H, H-1, H-1'), 1.51 (d, ³J= 7.2, 3H, H-8), 2.17 (th, ³J= 6.8 Hz, ³J= 6.8 Hz, 1H, H-2), 2.79 (d, ³J= 6.8 Hz, 2H, H-3), 4.57 (dq, ³J= 7.5 Hz, ³J= 7.2 Hz, 1H, H-7), 7.43 (br d, ³J= 7.5 Hz, 1H, H-6); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ= 17.9 (C-8), 22.6 (C-1, C-1'), 24.5 (C-2), 45.3 (C-3), 48.1 (C-7), 160.0 (C-5), 176.5 (C-9), 198.1 (C-4); MS (ESI, 10 eV, *m/z* (%)): 200.1 (71) [M-H]⁻, HR-MS (ESI, 10 eV, *m/z*): C₉H₁₄NO₄ 200.0928 [M-H]⁻; gemessen: 200.0927 [M-H]⁻; IR: ν_{max}= 669, 1158, 1522, 1675, 1723, 2341, 2357, 2959 cm⁻¹.



4.3.2.6 3-Methyl-2-(4-methyl-2-oxopentanamido)-butansäure (124c) [CK 131]

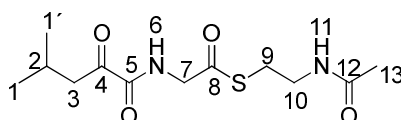
Analog zu AAV 6 wurde eine Suspension aus dem Benzylester **123c** (1.43 g, 4.48 mmol) und Palladium (0.14 g, 10% aktiviert auf Kohlenstoff) in absolutem Methanol (15 mL) über Nacht unter H₂-Atmosphäre (1 bar) bei r.t. gerührt. Die Suspension wurde durch Celite® 545 filtriert, und der Filterkuchen wurde mit EtOAc (20 mL) gespült. Durch Entfernen der LM der vereinigten organischen Phasen unter vermindertem Druck wurde die Säure **124c** (0.94 g, 92%) als farbloses Öl erhalten; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 0.84 – 0.98 (m, 12H, H-1, H-1', H9, H-9'), 2.13 (th, ³J= 6.8 Hz, ³J= 6.8 Hz, 1H, H-2), 2.25 (dh, ³J= 6.7, ³J= 5.0 Hz, 1H, H-8), 2.75 (d, ³J= 6.8 Hz, 2H, H-3), 4.44 (dd, ³J= 9.1 Hz, ³J= 5.0 Hz, 1H, H-7), 7.43 (br d, ³J= 9.1 Hz, 1H, H-6); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ= 17.6 (C-9*), 19.1 (C-9*), 22.6 (C-1*, C-1*), 24.4 (C-2), 31.1 (C-8), 45.4 (C-3), 57.3 (C-7), 160.4 (C-5), 174.7 (C-10), 198.1 (C-4); MS (ESI, 10 eV, *m/z* (%)): 228.1 (84) [M-H]⁻, HR-MS (ESI, 10 eV, *m/z*): C₁₁H₁₈NO₄ 228.1241 [M-H]⁻; gemessen: 228.1228 [M-H]⁻; IR: ν_{max}= 668, 1150, 1370, 1525, 1673, 1718, 2341, 2358, 2962 cm⁻¹. * Zuordnung nicht gesichert.



4.3.2.7 S-2-Acetamidoethyl-2-(4-methyl-2-oxopentanamido)-ethanthioat (64a) [CK 136]

Analog AAV 4 wurde CDI (1.47 g, 9.07 mmol) zu einer Lösung aus der Säure **124a** (1.41 g, 7.54 mmol) in absolutem THF (30 mL) unter Ar-Atmosphäre bei r.t. zugegeben. Nach 10 min Rühren wurde *N*-Acetylcysteamin (**120**) (1.08 g, 9.05 mmol) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Das LM wurde unter vermindertem Druck abdestilliert, und der Rückstand wurde in EtOAc (20 mL) gelöst. Die organische Phase wurde mit Wasser (3x 5 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, und das LM wurde unter vermindertem Druck abdestilliert. Durch Aufreinigung mittels Säulenchromatographie (SiO₂, EtOAc, R_f=0.28) wurde der Thioester **64a** (1.30 g, 60%) als wachsartiger, weißer Feststoff erhalten; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 0.93 (d, ³J= 6.5 Hz, 6H, H-1, H-1'), 1.95 (s, 3H, H-13), 2.16 (th, ³J= 6.5 Hz, ³J= 6.5 Hz, 1H, H-2), 2.77 (d, ³J= 6.5 Hz, 2H, H-3), 3.06 (t,

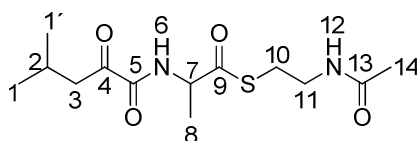
$^3J = 6.5$ Hz, 2H, H-9), 3.36 – 3.44 (m, 2H, H-10), 4.21 (d, $^3J = 6.4$ Hz, 2H, H-7), 6.09 (br s, 1H, H-11) 7.65 (br s, 1H, H-6); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 22.6$ (C-1, C-1'), 23.2 (C-13), 24.5 (C-2), 28.6 (C-9), 39.2 (C-10), 45.4 (C-3), 49.0 (C-7), 160.7 (C-5), 170.6 (C-12), 196.1 (C-8), 197.9 (C-4); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 311.1 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4\text{SNa}$ 311.1036 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gemessen: 311.1023 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR: $\nu_{\text{max}} = 592, 1367, 1466, 1521, 1675, 2362, 2958, 3305 \text{ cm}^{-1}$.



4.3.2.8 S-2-Acetamidoethyl-2-(4-methyl-2-oxopentanamido-propanthioat (64b) [CK 134]

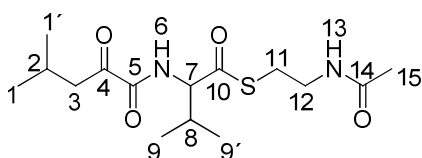
Analog AAV 4 wurde CDI (0.72 g, 4.44 mmol) zu einer Lösung aus der Säure **124b** (0.74 g, 3.68 mmol) in absolutem CH_2Cl_2 (25 mL) unter Ar-Atmosphäre bei r.t. zugegeben. Nach 10 min Rühren wurde *N*-Acetylcysteamin (**120**) (0.53 g, 4.44 mmol) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Das LM wurde unter vermindertem Druck abdestilliert, und der Rückstand wurde in EtOAc (20 mL) gelöst. Die organische Phase wurde mit Wasser (3x 5 mL) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, und das LM wurde unter vermindertem Druck abdestilliert. Durch Aufreinigung mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , EtOAc, $R_f = 0.40$) wurde der Thioester **64b** (1.30 g, 60%) als wachsartiger, weißer Feststoff erhalten; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.89$ (d, $^3J = 6.7$ Hz, 3H, H-1*), 0.90 (d, $^3J = 6.7$ Hz, 3H, H-1*), 1.47 (d, $^3J = 7.4$ Hz, 3H, H-8), 1.96 (s, 3H, H-14), 2.11 – 2.44 (m, 1H, H-2), 2.79 (dd, $^3J = 6.9$ Hz, $^2J = 3.0$ Hz, 2H, H-3), 3.03 – 3.08 (m, 2H, H-10), 3.40 – 3.47 (m, 2H, H-11), 4.62 (dq, $^3J = 7.6$ Hz, $^3J = 7.4$ Hz, 1H, H-7), 5.85 (br s, 1H, H-12), 7.35 (br d, $^3J = 7.6$ Hz, 1H, H-6); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 18.5$ (C-8), 22.65 (C-1*), 22.67 (C-1*), 23.3 (C-14), 24.6 (C-2), 28.7 (C-10), 39.3 (C-11), 45.4 (C-3), 55.3 (C-7), 160.0 (C-5), 170.5 (C-13), 198.0 (C-9), 200.0 (C-4); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 325.1 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4\text{SNa}$ 325.1192 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gemessen: 325.1179 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR: $\nu_{\text{max}} = 669, 1683, 2340, 2358, 2958, 3301 \text{ cm}^{-1}$.

* Zuordnung nicht gesichert.



4.3.2.9 S-2-Acetamidoethyl 3-methyl-2-(4-methyl-2-oxopentanamido)-butanthioat (**64c**) [CK 133]

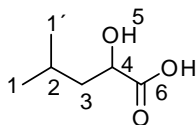
Analog AAV 4 wurde CDI (0.50 g, 3.18 mmol) zu einer Lösung aus der Säure **124c** (0.56 g, 2.56 mmol) in absolutem CH₂Cl₂ (10 mL) unter Ar-Atmosphäre bei r.t. zugegeben. Nach 10 min Rühren wurde *N*-Acetylcysteamin (**120**) (0.37 g, 3.18 mmol) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Das LM wurde unter vermindertem Druck abdestilliert, und der Rückstand wurde in EtOAc (20 mL) gelöst. Die organische Phase wurde mit Wasser (3x 5 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, und das LM wurde unter vermindertem Druck abdestilliert. Durch Aufreinigung mittels Säulenchromatographie (SiO₂, EtOAc, R_f=0.48) wurde der Thioester **64c** (1.30 g, 60%) als wachsartiger, weißer Feststoff erhalten; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 0.85 – 0.98 (m, 12H, H-1, H-1', H-9, H-9'), 1.92 (s, 3H, H-15), 2.15 (th, ³J= 6.6 Hz, ³J= 6.3 Hz, 1H, H-2), 2.25 (dh, ³J= 6.7 Hz, ³J= 6.7 Hz, 1H, H-8), 2.76 (d, ³J= 6.8 Hz, 2H, H-3), 3.02 (t, ³J= 6.5 Hz, 2H, H-11), 3.33 – 3.42 (m, 2H, H-12), 4.48 (dd, ³J= 9.3 Hz, ³J= 5.0 Hz, 1H, H-7), 6.10 (br s, 1H, H-13), 7.35 (br d, ³J= 9.3 Hz, 1H, H-6); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ= 17.1 (C-9*), 19.4 (C-9*), 22.57 (C-1*), 22.59 (C-1*), 23.2 (C-15), 24.6 (C-2), 28.6 (C-11), 31.2 (C-8), 39.3 (C-12), 45.3 (C-3), 64.2 (C-7), 160.4 (C-5), 170.5 (C-14), 198.0 (C-10), 199.1 (C-4); MS (ESI, 10 eV, *m/z* (%)): 353.2 (100) [M+Na]⁺, HR-MS (ESI, 10 eV, *m/z*): C₁₅H₂₆N₂O₄SNa 353.1505 [M+Na]⁺; gemessen: 353.1508 [M+Na]⁺; IR: ν_{max}= 594, 1287, 1369, 1511, 1661, 2360, 2873, 2960, 3292 cm⁻¹. * Zuordnung nicht gesichert.



4.3.2.10 2-Hydroxy-4-methylpentansäure (**80a**) [CK 5]¹⁰¹

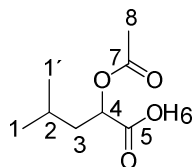
Zu einer Suspension aus *L*-Leucin (**127**) (10.7 g, 81.6 mmol) in Wasser (60 mL) wurde bei 0 °C Schwefelsäure (40 mL, *c* = 1 M in H₂O) langsam zugetropft. Anschließend wurde bei 0 °C eine NaNO₂-Lösung (45 mL, *c* = 2 M in H₂O) zugetropft, und die Reaktionslösung wurde für weitere 3 h bei 0 °C und anschließend 15 h bei r.t. gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit EtOAc (3 x 50 mL) extrahiert, und die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet. Das LM wurde unter vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand zweimal aus Et₂O/ *n*-Hexan umkristallisiert. Erhalten wurde die α-Hydroxysäure **80a** (7.11 g, 66%) als weißer Feststoff; Smp.: 79- 80 °C; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ= 0.99 (d, ³J= 6.6 Hz, 3H, H-1*), 1.00 (d, ³J= 6.6 Hz, 3H, H-1*), 1.52 – 1.59 (m, 2H, H-3), 1.79 – 1.91 (m, 1H, H-2), 4.10 – 4.16 (m,

^1H , H-4), 4.92 (br s, 1H, H-5); ^{13}C -NMR (75 MHz, CD_3OH): δ = 21.9 (C-1 *), 23.7 (C-1 *), 25.5 (C-2), 44.5 (C-3), 70.0 (C-4), 178.5 (C-6). * Zuordnung nicht gesichert.



4.3.2.11 2-Acetoxy-4-methylpentansäure (80b) [CK 26]¹⁰²

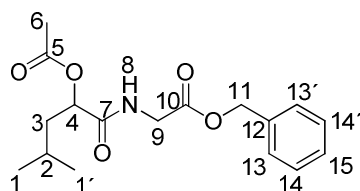
Eine Lösung aus der Säure **80a** (2.50 g, 18.92 mmol) in Essigsäurechlorid (2.50 mL, 35.00 mmol) wurde für 2 h bei r.t. gerührt. Das LM wurde unter vermindertem Druck abdestilliert. Trocknung des Rückstandes im Hochvakuum über Nacht ergab die acetylierte Hydroxysäure **80b** (3.16 g, 96%) als farbloses Öl; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 0.93 (d, 3J = 6.4 Hz, 3H, H-1 *), 0.96 (d, 3J = 6.4 Hz, 3H, H-1 *), 1.61 – 1.89 (m, 3H, H-2, H-3), 2.13 (s, 3H, H-8), 5.00 – 5.09 (m, 1H, H-4), 11.29 (br s, 1H, H-6); ^{13}C -NMR (75 MHz, CD_3OH): δ = 20.7 (C-8), 21.7 (C-1 *), 23.1 (C-1 *), 24.8 (C-2), 39.7 (C-3), 70.7 (C-4), 170.9 (C-7), 177.0 (C-5). * Zuordnung nicht gesichert.



4.3.2.12 2-(2-Acetoxy-4-methylpentanamido)-essigsäurebenzylester (128a) [CK 345]

Analog zu AAV 1 wurde zu einer Lösung aus der Säure **80b** (2.00 g, 11.48 mmol) in absolutem CH_2Cl_2 (45 mL) bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre EDC-HCl (2.64 g, 13.78 mmol) und HOBt (2.11 g, 13.78 mmol) zugeben, und die Reaktionslösung wurde für 30 min bei 0 °C gerührt. Abweichend von der AAV wurde Diisopropylethylamin DIEA (6.00 mL, 33.44 mmol) anstelle von 4-DMAP zugetropft, anschließend wurde Glycinbenzylester Hydrochlorid (**122a**) (2.78 g, 13.78 mmol) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt und mit EtOAc (150 mL) verdünnt. Die organische Phase wurde mit gesättigter wässriger NH_4Cl -Lösung (3 x 20 mL), gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lsg (3 x 20 mL) und gesättigter wässriger NaCl -Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Na_2SO_4 wurden die LM unter vermindertem Druck abdestilliert. Durch Aufreinigung des Rohprodukts mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , EtOAc/ α -Hexan, 1/1, v/v, R_f = 0.64) wurde der Benzylester **128a** (2.96 g, 80%) als farbloses Öl erhalten; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 0.92 (d, 3J = 6.6 Hz, 3H, H-1 *), 0.93 (d, 3J = 6.5 Hz, 3H, H-1 *), 1.42 – 1.63 (m, 3H, H-2, H-3), 2.14 (s, 3H, H-6), 4.08 (d, 2J = 3.9 Hz, 1H, H-9 $_a$), 4.09 (d, 2J = 3.9 Hz, 1H, H-9 $_b$), 5.19 (s, 2H, H-11), 5.21 – 5.26 (m, 1H, H-4),

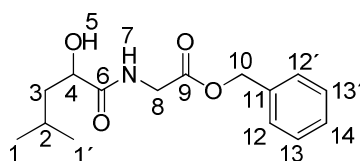
5.53 (br s, 1H, H-8), 7.30 – 7.41 (m, 5H, H-13, H-13', H-14, H-14', H-15); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 21.0 (C-6), 21.9 (C-1*), 23.2 (C-1'), 24.7 (C-2), 40.9 (C-3), 42.2 (C-9), 67.5 (C-11), 72.8 (C-4), 128.6 (C-13*, C-13'), 128.76 (C-15), 128.81 (C-14*, C-14'), 135.1 (C-12), 169.6 (C-10*), 169.9 (C-5*), 170.7 (C-7*); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 344.2 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 322.2 (31) $[\text{M}+\text{H}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{NO}_5\text{Na}$ 344.1468 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gemessen: 344.1456 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR: ν_{max} = 697, 736, 1185, 1217, 1665, 1741, 2957, 3325 cm^{-1} . * Zuordnung nicht gesichert.



4.3.2.13 2-(2-Hydroxy-4-methylpentanamido)-essigsäurebenzylester (128b)

[CK 346]¹⁰³

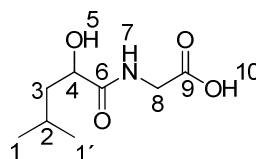
Zu einer Lösung aus dem Benzylester **128a** (1.00 g, 3.11 mmol) in Methanol (9 mL) und Wasser (3 mL) wurde bei r.t. portionsweise LiOH (0.22 g, 9.33 mmol) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde für 2 h bei r.t. gerührt. Nach dem Entfernen der LM unter vermindertem Druck wurde der Rückstand in EtOAc (30 mL) gelöst. Die organische Phase wurde mit gesättigter wässriger NH_4Cl -Lösung (2 x 10 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Nach dem Entfernen des LM unter vermindertem Druck wurde der sekundäre Alkohol **128b** (0.87 g, quant.) als farbloses Öl erhalten und ohne weitere Aufreinigung weiter verwendet; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 0.92 (d, 3J = 6.6 Hz, 3H, H-1*), 0.93 (d, 3J = 6.5 Hz, 3H, H-1'), 1.42 – 1.63 (m, 2H, H-3), 1.73 – 1.91 (m, 1H, H-2), 3.93 (dd, 2J = 18.2 Hz, 3J = 5.3 Hz, 1H, H-8_a), 4.04 – 4.25 (m, 2H, H-4, H-8_b), 4.70 (s, 2H, H-10), 7.25 – 7.42 (m, 5H, H-12, H-12', H-13, H-13', H-14), 7.53 (br t, 3J = 5.3 Hz, 1H, H-7); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 21.4 (C-1*), 23.5 (C-1'), 24.6 (C-2), 41.0 (C-3), 43.3 (C-8), 65.5 (C-10), 70.9 (C-4), 127.2 (C-12*, C-12'), 127.9 (C-14), 128.7 (C-13*, C-13'), 140.8 (C-11), 173.0 (C-9*), 176.9 (C-6*); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 302.2 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 280.2 (32) $[\text{M}+\text{H}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}_4\text{Na}$ 302.1363 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gemessen: 302.1358 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR: ν_{max} = 697, 835, 1209, 1533, 1651, 1724, 2955, 3352 cm^{-1} . * Zuordnung nicht gesichert.



4.3.2.14 2-(2-Hydroxy-4-methylpentanamido)essigsäure (129) [CK 348]

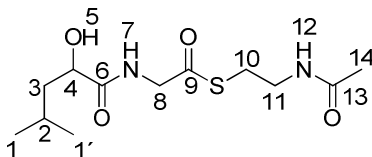
Analog zu AAV 6 wurde eine Suspension aus dem Benzylester **128b** (0.87 g, 3.11 mmol) und Palladium (0.09 g, 10% aktiviert auf Kohlenstoff) in absolutem Methanol (10 mL) über Nacht unter H₂-Atmosphäre (1 bar) bei r.t. gerührt. Die Suspension wurde durch Celite® 545 filtriert, und der Filterkuchen wurde mit EtOAc (20 mL) gespült. Durch Entfernen der LM der vereinigten organischen Phasen unter vermindertem Druck wurde die Säure **129** (0.58 g, 88%) als farbloses Öl erhalten; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 0.92 (d, ³J= 6.0 Hz, 3H, H-1*), 0.93 (d, ³J= 6.2 Hz, 3H, H-1*), 1.42 – 1.72 (m, 2H, H-3), 1.74 – 1.92 (m, 1H, H-2), 3.92 (dd, ²J= 18.0 Hz, ³J= 4.6 Hz, 1H, H-8_a), 4.11 (dd, ²J= 18.0 Hz, ³J= 5.8 Hz, 1H, H-8_b), 4.19 (dd, ³J= 9.3 Hz, ³J= 3.5 Hz, 1H, H-4), 7.61 (br t, ³J= 5.5 Hz, 1H, H-7); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ= 21.4 (C-1*), 23.5 (C-1*), 24.6 (C-2), 41.1 (C-3), 43.3 (C-8), 70.9 (C-4), 172.9 (C-9), 177.1 (C-6); MS (ESI, 10 eV, *m/z* (%)): 188.1 (100) [M-H]⁻; HR-MS (ESI, 10 eV, *m/z*): C₈H₁₄NO₄ 188.0928 [M-H]⁻; gemessen: 188.0926 [M-H]⁻; IR: ν_{max}= 1073, 1140, 1203, 1537, 1623, 2871, 2956, 3376 cm⁻¹.

* Zuordnung nicht gesichert.

**4.3.2.15 S-(2-Acetamidoethyl)-2-(2-hydroxy-4-methylpentanamido)-ethanthopat (69) [CK 351]**

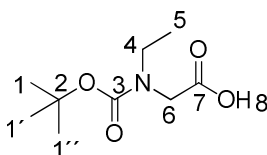
EDC-HCl (0.64 g, 3.34 mmol) wurde unter Ar-Atmosphäre bei 0 °C zu einer Lösung aus der Säure **129** (0.53 g, 2.78 mmol), *N*-Acetylcysteamin (**120**) (0.44 mL, 4.17 mmol), HOBt (0.57 g, 3.34 mmol) und katalytischen Mengen an 4-DMAP in wasserfreiem CH₂Cl₂ (10 mL) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit EtOAc (50 mL) verdünnt und mit gesättigter wässriger NH₄Cl-Lösung (10 mL), gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung (10 mL), Wasser (10 mL) und gesättigter wässriger NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über MgSO₄ wurden die LM unter vermindertem Druck entfernt. Aufreinigung des Rohprodukts mittels Säulenchromatographie (SiO₂, EtOAc, R_f= 0.15) ergab den Thioester **69** (0.33 g, 41%) als weißen wachsartigen Feststoff; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 0.91 (d, ³J= 6.6 Hz, 3H, H-1*), 0.92 (d, ³J= 6.6 Hz, 3H, H-1*), 1.49 – 1.65 (m, 2H, H-3), 1.79 – 1.90 (m, 1H, H-2), 1.93 (s, 3H, H-14), 3.01 (t, ³J= 6.5 Hz, 2H, H-10), 3.31 – 3.40 (m, 2H, H-11), 4.12 – 4.23 (m, 3H, H-4, H-8), 6.68 (br t, ³J= 5.7 Hz, 1H, H-12), 7.68 (br t, ³J= 6.1 Hz, 1H, H-7); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ= 21.4 (C-1*), 23.1 (C-14*), 23.6 (C-1*), 24.5 (C-2), 28.4 (C-10), 39.2 (C-11), 43.5 (C-3),

49.0 (C-8), 70.7 (C-4), 171.2 (C-13), 176.2 (C-6), 197.7 (C-9); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 313.1 (100) $[M+Na]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $C_{12}H_{22}NO_4SNa$ 313.1192 $[M+Na]^+$; gemessen: 313.1188 $[M+Na]^+$; IR: ν_{max} = 1077, 1142, 1235, 1290, 1360, 1547, 1626, 1650, 2957, 3303 cm^{-1} . * Zuordnung nicht gesichert.



4.3.2.16 N-Ethyl-N-(tert-butoxycarbonyl)-glycine (**125b**) [CK 289]⁹⁹

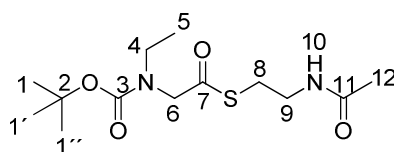
Eine Lösung aus *N*-Ethylglycine (**125a**) (0.50 g, 4.85 mmol) und Boc_2O (2.91 g, 13.33 mmol) in NEt_3 (3.76 mL, 27.12 mmol) und H_2O (18 mL) wurde für 24 h bei r.t. gerührt. Nachdem die wässrige Lösung mit *c*-Hexan (3 x 20 mL) gewaschen wurde, wurde die wässrige Phase mit verdünnter, wässriger HCl-Lösung ($c \approx 4$ M) auf pH= 2 angesäuert. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 x 20 mL) extrahiert, und die vereinigten org. Phasen wurden mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung (2 x 10 mL) gewaschen und über $MgSO_4$ getrocknet. Durch Entfernen des LM unter vermindertem Druck wurde das Glycin **125b** (0.57 g, 58%) als farbloses Öl in zwei Rotameren erhalten; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 0.11 (t, 3J = 7.2 Hz, 3H, H-5), 1.41 und 1.46 (zwei s, 9H, H-1, H-1', H-1''), 3.32 (br q, 3J = 7.2 Hz, 2H, H-4), 3.89 und 3.98 (zwei s, 2H, H-6), 10.38 (br s, 1H, H-8).



4.3.2.17 S-(2-Acetamidoethyl)-2-((tert-butoxycarbonyl)(ethyl)amino)ethanthioat (**126**) [CK 295]¹⁶⁶

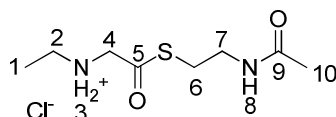
Zu einer Lösung aus dem Glycinderivat **125b** (0.17 g, 0.84 mmol), HOBt (0.19 g, 1.27 mmol) und *N*-Acetylcysteamine (**120**) (0.98 mL, 0.95 mmol) in absolutem CH_2Cl_2 (10 mL) wurde bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre eine Lösung aus DCC (0.24 g, 1.16 mmol) in absolutem CH_2Cl_2 (2 mL) langsam zugetropft, und die Reaktionslösung wurde für 2 h bei 0 °C und anschließend 16 h bei r. t. gerührt. Nach dem Filtrieren der entstandenen Suspension wurde das LM des Filtrats unter vermindertem Druck abdestilliert. Aufreinigung des Rohprodukts mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , EtOAc, R_f = 0.23) ergab den Thioester **126** (0.22 g, 85%) als wachsartigen, weißen Feststoff in zwei Rotameren; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.06 (t, 3J = 7.1 Hz, 3H,

H-5), 1.36 und 1.42 (zwei s, 9H, H-1, H-1', H-1''), 1.89 (s, 3H, H-12), 2.98 (t, $^3J = 6.5$ Hz, 2H, H-8), 3.19 – 3.43 (m, 4H, H-4, H-9), 3.93 und 3.99 (zwei s, 2H, H-6), 5.95 und 6.05 (zwei br s, 1H, H-10); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 13.4$ und 13.7 (C-5), 23.2 (C-12), 28.1 und 28.2 (C-8), 28.4 und 28.5 (C-1, C-1', C-1''), 39.4 und 39.7 (C-9), 43.3 und 43.9 (C-4), 56.6 und 56.7 (C-6), 170.4 und 170.6 (C-11), 199.3 und 199.5 (C-7);); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 327.1 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4\text{SNa}$ 327.1349 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gemessen: 327.1341 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR: $\nu_{\text{max}} = 1147, 1167, 1654, 2341, 2359, 2975, 3293 \text{ cm}^{-1}$.



4.3.2.18 S-(2-Acetamidoethyl) 2-(ethylamino)ethanthioat Hydrochlorid **65** [CK 301]¹⁰⁰

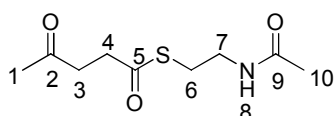
Eine Lösung aus dem Thioester **126** (0.14 g, 0.46 mmol) in verdünnter Salzsäure (2 mL, $c = 4$ M in 1,4-Dioxan) wurde für 2 h bei r.t. gerührt. Entfernen des LM unter vermindertem Druck und Trocknung des Rückstands über Nacht unter Hochvakuum ergab den Thioester **65** (0.11 g, quant.) als weißen Feststoff; ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 1.19$ (t, $^3J = 7.3$ Hz, 3H, H-1), 1.80 (s, 3H, H-10), $2.86 - 3.00$ (m, 2H, H-2), 3.04 (t, $^3J = 6.6$ Hz, 2H, H-6), $3.17 - 3.27$ (m, 2H, H-7), 4.21 (d, $^2J = 5.8$ Hz, 1H, H-4_a), 4.23 (d, $^3J = 5.8$ Hz, 1H, H-4_b), 8.21 (br t, $^3J = 5.2$ Hz, 1H, H-8), 9.54 (br s, 2H, H-3); ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 10.7$ (C-1), 22.5 (C-10), 28.2 (C-6), 37.9 (C-7), 42.0 (C-2), 53.4 (C-4), 169.4 (C-9), 192.7 (C-5); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 205.1 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ 205.1005 $[\text{M}+\text{H}]^+$, $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{SNa}$ 227.0825 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gemessen: 205.1011 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 227.0823 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR: $\nu_{\text{max}} = 591, 976, 1644, 1692, 2430, 2677, 2930, 3221 \text{ cm}^{-1}$.



4.3.2.19 S-(2-Acetamidoethyl)-4-oxopentanthioat (**66**) [CK 266]

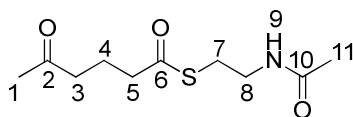
Analog zu AAV 3 wurde zu einer Lösung aus der Säure **130a** (0.50 g, 4.30 mmol) in wasserfreiem CH_2Cl_2 (50 mL) EDC-HCl (0.99 g, 5.16 mmol) und HOBt (0.70 g, 5.16 mmol) bei 0°C unter Ar-Atmosphäre zugegeben, und die Reaktionslösung wurde für 30 min bei 0°C gerührt. Anschließend wurden N-Acetylcysteamin (**120**) (0.62 g, 5.16 mmol) und katalytische Mengen an 4-DMAP zugegeben, und die Reaktionslösung

wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Nach der Zugabe von gesättigter wässriger NH_4Cl -Lösung (10 mL) wurden die Phasen getrennt, und die wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen und anschließend über Na_2SO_4 getrocknet. Nach dem Abdestillieren des LM unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO_2 , EtOAc, $R_f = 0.23$) aufgereinigt. Erhalten wurde der Thioester **66** (0.65 g, 70%) als weißer, wachsartiger Feststoff; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.92$ (s, 3H, H-10), 2.15 (s, 3H, H-1), 2.73 – 2.85 (m, 4H, H-3, H-4), 2.99 (t, $^3J = 6.1$ Hz, 2H, H-6), 3.34 – 3.43 (m, 2H, H-7), 6.11 (br s, 1H, H-8); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 23.20$ (C-10), 28.6 (C-1), 29.8 (C-6), 37.6 (C-4), 38.2 (C-3), 39.5 (C-7), 170.6 (C-9), 198.7 (C-5), 206.3 (C-2); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 240.1 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{NO}_3\text{S}$ 240.0665 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gemessen: 240.0669 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR: $\nu_{\text{max}} = 989, 1286, 1370, 1540, 1652, 1714, 2357, 3291 \text{ cm}^{-1}$.



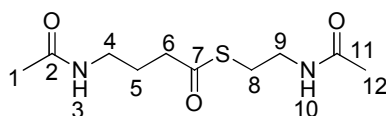
4.3.2.20 S-2-Acetamidoethyl 5-oxohexanthioat (**67**) [CK 94]

Analog AAV 4 wurde CDI (1.50 g, 9.22 mmol) zu einer Lösung aus 4-Acylbutansäure (**130b**) (1.00 g, 27.68 mmol) in absolutem CH_2Cl_2 (30 mL) unter Ar -Atmosphäre bei r.t. zugegeben. Nach 10 min Rühren wurde *N*-Acetylcysteamin (**120**) (1.10 g, 9.22 mmol) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Das LM wurde unter vermindertem Druck abdestilliert, und der Rückstand wurde in EtOAc (20 mL) gelöst. Die organische Phase wurde mit Wasser (3x 5 mL) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, und das LM wurde unter vermindertem Druck abdestilliert. Durch Aufreinigung mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , EtOAc, $R_f = 0.22$) wurde der Thioester **67** (1.74 g, quant.) als wachsartiger, weißer Feststoff erhalten; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.92$ (tt, $^3J = 7.1$ Hz, $^3J = 7.1$ Hz, 2H, H-4), 1.96 (s, 3H, H-11), 2.13 (s, 3H, H-1), 2.49 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 2H, H-5), 2.59 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 2H, H-3), 3.01 (t, $^3J = 6.2$ Hz, 2H, H-7), 3.38 – 3.45 (m, 2H, H-8), 5.97 (br s, 1H, H-9); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 19.5$ (C-4), 23.3 (C-11), 28.7 (C-7), 30.1 (C-1), 39.6 (C-8), 42.2 (C-5), 43.0 (C-3), 170.4 (C-10), 199.5 (C-6), 207.9 (C-2); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 254.1 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{NO}_3\text{SNa}$ 254.0821 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gemessen: 254.0822 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR: $\nu_{\text{max}} = 669, 1371, 1540, 1653, 1683, 1712, 2340, 2358, 3294 \text{ cm}^{-1}$.



4.3.2.21 S-2-acetamidoethyl-4-acetamidobutanethioat (68) [CK 93]

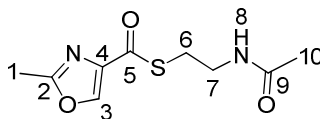
Analog zu AAV 3 wurde zu einer Lösung aus der Säure **130c** (1.00 g, 6.89 mmol) in wasserfreiem CH_2Cl_2 (25 mL) EDC-HCl (1.58 g, 8.24 mmol) und HOBt (1.27 g, 8.24 mmol) bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre zugegeben, und die Reaktionslösung wurde für 30 min bei 0°C gerührt. Anschließend wurden *N*-Acetylcysteamin (**120**) (0.99 g, 8.24 mmol) und katalytische Mengen an 4-DMAP zugegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Nach der Zugabe von gesättigter wässriger NH_4Cl -Lösung (10 mL) wurden die Phasen getrennt, und die wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen und anschließend über Na_2SO_4 getrocknet. Nach dem Abdestillieren des LM unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO_2 , EtOAc, R_f = 0.10) aufgereinigt. Erhalten wurde der Thioester **68** (0.13 g, 20%) als weißer, wachsartiger Feststoff; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.85 (tt, 3J = 7.1 Hz, 3J = 7.1 Hz, 2H, H-5), 1.95 (s, 3H, H-1*), 1.96 (s, 3H, H-12*), 2.60 (t, 3J = 7.1 Hz, 2H, H-6), 3.01 (t, 3J = 6.3 Hz, 2H, H-8), 3.22 – 3.29 (m, 2H, H-4), 3.37 – 3.45 (m, 2H, H-9), 6.10 (br s, 1H, H-10*), 6.50 (br s, 1H, H-3*); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 23.2 (C-1*), 23.4 (C-12*), 25.4 (C-5), 29.0 (C-8), 38.4 (C-9*), 39.3 (C-4*), 41.1 (C-6), 170.7 (C-2*), 170.8 (C-11*), 199.3 (C-7); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 269.1 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3\text{SNa}$ 269.0930 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gemessen: 269.0938 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR: ν_{max} = 649, 1289, 1366, 1544, 1634, 2359, 2930, 3080, 3273 cm^{-1} . * Zuordnung nicht gesichert.



4.3.2.22 S-(2-Acetamidoethyl)-2-methyloxazol-4-carbothioat (70) [CK 349]¹⁰⁵

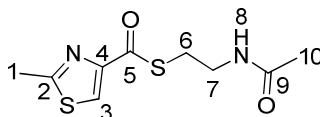
Zu einer Suspension aus der Säure **130d** (0.50 g, 3.93 mmol) in absolutem CH_2Cl_2 (60 mL) wurde unter Ar-Atmosphäre bei r.t. EDC-HCl (0.67 g, 3.50 mmol), *N*-Acetylcysteamin (**120**) (0.39 ml, 3.47 mmol) und katalytische Mengen an 4-DMAP zugegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Nach der Zugabe von gesättigter wässriger NH_4Cl -Lösung (40 mL) wurden die Phasen separiert, und die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet, und die LM wurden unter vermindertem Druck abdestilliert. Aufreinigung des Rohproduktes mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , $\text{CH}_3\text{Cl}/\text{MeOH}$, 95/5, v/v, R_f = 0.4) ergab den

Thioester **70** (0.65 g, 72%) als einen weißen, wachsartigen Feststoff; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.98 (s, 3H, H-10), 2.51 (s, 3H, H-1), 3.19 (t, 3J = 6.3 Hz, 2H, H-6), 3.50 (dt, 3J = 6.3 Hz, 3J = 6.2 Hz, 2H, H-7), 5.97 (br s, 1H, H-8), 8.11 (s, 1H, H-3).



4.3.2.23 S-(2-Acetamidoethyl) 2-methylthiazol-4-carbothioat (**71**) [CK 347]¹⁰⁵

Zu einer Suspension aus der Säure **130e** (0.50 g, 3.49 mmol) in absolutem CH_2Cl_2 (25 mL) und absolutem THF (12 mL) wurde unter Ar-Atmosphäre bei r.t. EDC-HCl (0.74 g, 3.86 mmol), *N*-Acetylcysteamin (**120**) (0.59 ml, 5.24 mmol) und katalytische Mengen an 4-DMAP zugegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Nach der Zugabe von gesättigter wässriger NH_4Cl -Lösung (40 mL) wurden die Phasen separiert, und die organische Phase wurde mit gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lösung (40 mL) gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit EtOAc (3 x 20 mL) extrahiert. Nach dem Trocknen der vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 wurden die LM unter vermindertem Druck abdestilliert. Aufreinigung des Rohproduktes mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , $\text{CH}_3\text{Cl}/\text{MeOH}$, 95/5, v/v, R_f = 0.45) ergab den Thioester **71** (0.88 g, 97%) als weißen, wachsartigen Feststoff; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.95 (s, 3H, H-10), 2.77 (s, 3H, H-1), 3.20 (t, 3J = 6.3 Hz, 2H, H-6), 3.52 (dt, 3J = 6.3 Hz, 3J = 6.2 Hz, 2H, H-7), 5.97 (br s, 1H, H-8), 7.97 (s, 1H, H-3).

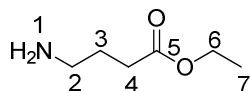


4.3.3 Substrate zur Analyse der Bacillaen KS 2 Substratspezifität

4.3.3.1 4-Aminobutansäureethylester Hydrochlorid (**131b**) [CK 19]¹⁶⁷

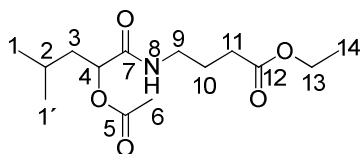
Zu einer Lösung aus 4-Aminobuttersäure (**131a**) (2.00 g, 19.41 mmol) in wasserfreien Ethanol (40 mL) wurde bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre langsam Thionylchlorid (1.58 mL, 21.69 mmol) zugetropft. Anschließend wurde die Reaktionslösung für 2 h im Rückfluss erhitzt. Das LM wurde unter vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand wurde in gesättigter wässriger Na_2CO_3 -Lösung (20 mL) gelöst. Die wässrige Phase wurde mit Et_2O (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit Na_2SO_4 getrocknet, und das LM wurde unter vermindertem Druck entfernt. Erhalten wurde der Ethylester **131b** (2.16 g, 85%) als hellgelbes Öl; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.21 (t,

$^3J = 7.3$ Hz, 3H, H-7), 1.28 (br s, 2H, H-1), 1.72 (tt, $^3J = 7.5$ Hz, $^3J = 7.5$ Hz, 2H, H-3), 2.30 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 2H, H-4), 2.68 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 2H, H-2), 4.08 (q, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, H-6); ^{13}C -NMR (75 MHz, CD_3OH): $\delta = 14.3$ (C-7), 28.9 (C-3), 31.8 (C-4), 41.6 (C-2), 60.4 (C-6), 173.6 (C-5).



4.3.3.2 4-(2-Acetoxy-4-methylpentanamido)-butansäureethylester (132a) [CK 40]

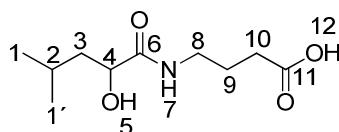
Analog zu AAV 1 wurde zu einer Lösung der Säure **80b** (1.00 g, 5.80 mmol) in wasserfreiem CH_2Cl_2 (30 mL) bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre EDC-HCl (1.34 g, 6.99 mmol) und HOBt (0.94 g, 6.96 mmol) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde für 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde eine Lösung aus dem Amin **131b** (0.72 g, 6.98 mmol) in wasserfreiem CH_2Cl_2 (5 mL) sowie katalytische Mengen an 4-DMAP zugegeben und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Die Lösung wurde mit EtOAc (30 mL) verdünnt und mit gesättigter wässriger NH_4Cl -Lösung (2 x 15 mL), gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lösung (2 x 15 mL) und gesättigter wässriger NaCl -Lösung (2 x 15 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase mit Na_2SO_4 wurde das LM unter vermindertem Druck abdestilliert. Reinigung mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , n -Hexan/ EtOAc, 1/1, v/v, $R_f = 0.42$) ergab das Amid **132a** (1.37 g, 83%) als farbloses Öl; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.92$ (d, $^3J = 5.9$ Hz, 3H, H-1*), 0.93 (d, $^3J = 6.0$ Hz, 3H, H-1*), 1.26 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 3H, H-14), 1.66 – 1.74 (m, 3H, H-2, H-3), 1.84 (tt, $^3J = 6.8$ Hz, $^3J = 6.8$ Hz, 2H, H-10), 2.16 (s, 3H, H-6), 2.36 (t, $^3J = 6.8$ Hz, 2H, H-11), 3.27 – 3.35 (m, 2H, H-9), 4.13 (q, $^3J = 7.1$ Hz, 2H, H-13), 5.15 – 5.23 (m, 1H, H-4), 6.24 (br s, 1H, H-8); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 14.3$ (C-14), 21.1 (C-6), 21.8 (C-1*), 23.2 (C-1*), 24.2 (C-10), 24.7 (C-2), 31.9 (C-11), 41.0 (C-9), 60.7 (C-11), 72.8 (C-4), 170.0 (C-5), 170.6 (C-7), 174.1 (C-12); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 310.2 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{NO}_5\text{Na}$ 310.1625 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gemessen: 310.1628 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR: $\nu_{\text{max}} = 1025, 1174, 1222, 1371, 1534, 1734, 2958, 3304 \text{ cm}^{-1}$. * Zuordnung nicht gesichert.



4.3.3.3 4-(2-Hydroxy-4-methylpentanamido)-butansäure (132b) [CK 41]

Analog zu AVV 2 wurde zu einer Lösung aus dem Ethylester **132a** (0.21 mg, 0.73 mmol) in THF/ MeOH/ H_2O (2/2/1, v/v/v, 30 mL) LiOH (0.44 g, 18.37 mmol) zugegeben, und die

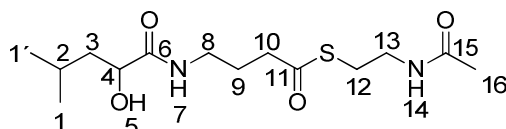
Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Nach dem Entfernen der organischen LM unter vermindertem Druck wurde die wässrige Phase mit EtOAc (2 x 15 mL) extrahiert. Anschließend wurde die wässrige Phase mit NaHSO₄ (c= 0.1 M in H₂O) auf pH= 2 angesäuert und mit EtOAc (3 x 15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung (20 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach dem Entfernen des LM unter vermindertem Druck wurde die Säure **132b** (0.14 g, 90%) als farbloses Öl erhalten und ohne weitere Aufreinigung verwendet; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 0.92 (d, ³J= 6.5 Hz, 3H, H-1^{*}), 0.93 (d, ³J= 6.5 Hz, 3H, H-1^{*}), 1.42 – 1.62 (m, 2H, H-3), 1.76 – 1.89 (m, 3H, H-2, H-9), 2.35 (t, ³J= 6.9 Hz, 2H, H-10), 3.21 – 3.42 (m, 2H, H-8), 4.13 (dd, ³J= 6.9 Hz, ³J= 3.3 Hz, 1H, H-4), 7.01 (br t, ³J= 6.7 Hz, 1H, H-7); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ= 21.5 (C-1^{*}), 23.6 (C-1^{*}), 24.7 (C-2), 24.8 (C-9), 31.6 (C-10), 38.7 (C-8), 43.8 (C-3), 70.9 (C-4), 176.6 (C-11), 177.9 (C-6); MS (ESI, 10 eV, *m/z* (%)): 240.1 (100) [M+Na]⁺, 457.3 (67) [2M+Na]⁺, 674.4 (17) [3M+Na]⁺; HR-MS (ESI, 10 eV, *m/z*): C₁₀H₁₈NO₄ 216.1241 [M]⁻; gemessen: 216.1239 [M]⁻; IR: ν_{max}= 1069, 1141, 1176, 1244, 1386, 1540, 1627, 1708, 2359, 2955, 3338 cm⁻¹. * Zuordnung nicht gesichert.



4.3.3.4 4-(2-Hydroxy-4-methylpentanamido)-butansäure-acetamidoethyl-thioester (**72**) [CK 43]

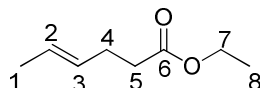
Analog zu AAV 3 wurde zu einer Lösung aus der Säure **132b** (0.45 g, 2.06 mmol) in wasserfreiem CH₂Cl₂ (25 mL) EDC HCl (0.47 g, 2.45 mmol) und HOBt (0.34 g, 2.52 mmol) bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre zugegeben, und die Reaktionslösung wurde für 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde *N*-Acetylcysteamin (**120**) (0.30 g, 2.49 mmol) und katalytische Mengen an 4-DMAP zugegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Nach der Zugabe von gesättigter wässriger NH₄Cl-Lösung (10 mL) wurden die Phasen getrennt, und die wässrige Phase wurde mit CH₂Cl₂ (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen und anschließend über Na₂SO₄ getrocknet. Nach dem Abdestillieren des LM unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO₂, EtOAc, R_f= 0.13) aufgereinigt. Erhalten wurde der Thioester **72** (0.13 g, 20%) als weißer, wachsartiger Feststoff; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 0.94 (d, ³J= 6.6 Hz, 3H, H-1^{*}), 0.95 (d, ³J= 6.6 Hz, 3H, H-1^{*}), 1.45 – 1.69 (m, 2H, H-3), 1.79 – 1.95 (m, 3H, H-2, H-9), 1.98 (s, 3H, H-16), 2.62 (t, ³J= 6.9 Hz, 2H, H-10), 2.96 – 3.10 (m, 2H, H-12), 3.24 – 3.36 (m, 2H, H-8), 3.38 – 3.48 (m, 2H, H-13), 4.12 (dd, ³J= 9.7 Hz, ³J= 3.3 Hz, 1H, H-4), 6.56

(br t, $^3J = 6.6$ Hz, 1H, H-14*), 6.89 (br t, $^3J = 6.0$ Hz, 1H, H-7*); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 21.5$ (C-1*), 23.2 (C-16*), 23.6 (C-1*), 24.7 (C-2), 25.4 (C-9), 29.0 (C-12), 37.9 (C-10), 39.3 (C-13), 41.1 (C-8), 44.0 (C-3), 70.9 (C-4), 171.0 (C-15), 175.2 (C-6), 199.3 (C-11); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 341.2 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 319.2 (41) $[\text{M}+\text{H}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4\text{SNa}$ 341.1505 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gemessen: 341.1510 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR: $\nu_{\text{max}} = 1071$, 1098, 1141, 1226, 1288, 1365, 1533, 1645, 2954, 3296 cm^{-1} . * Zuordnung nicht gesichert.



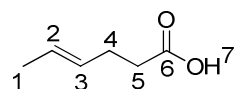
4.3.3.5 *trans*-Hex-4-ensäureethylester (**135a**) [CK 100]¹⁰⁸

Essigsäure (0.12 ml, 2.10 mmol) wurde zu einer Lösung aus But-3-en-2-ol (**134**) (5.00 mL, 58.28 mmol) und Triethylorthoacetat (**134**) (15.97 mL, 87.43 mmol) gegeben, und die Reaktionslösung wurde für 5 h auf 140 °C – 150 °C erhitzt, wobei entstehendes Ethanol kontinuierlich aus der Reaktionslösung destillativ abgetrennt wurde. Anschließend wurde der Ethylester **135a** (7.38 g, 90%) mittels Vakuumdestillation aufgereinigt; Sdp.: 93 °C (60 mb ar); ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.26$ (t, $^3J = 7.2$ Hz, 3H, H-8), 1.65 (d, $^3J = 4.5$ Hz, 3H, H-1), 2.21 – 2.37 (m, 4H, H-4, H-5), 4.14 (q, $^3J = 7.2$ Hz, 2H, H-7), 5.32 – 5.50 (m, 2H, H-2, H-3).



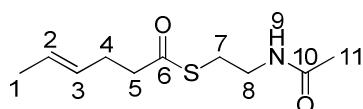
4.3.3.6 *trans*-Hex-4-ensäure (**135b**) [CK 102]

Analog AAV 2 wurde zu einer Lösung aus dem Ester **135a** (1.00 g, 7.03 mmol) in THF/ MeOH/ H_2O (2/2/1, v/v/v, 290 mL) LiOH (4.26 g, 177.87 mmol) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Nach dem Entfernen der organischen LM unter vermindertem Druck wurde die wässrige Phase mit EtOAc (2 x 15 mL) extrahiert. Anschließend wurde die wässrige Phase mit NaHSO_4 ($c = 0.1$ M in H_2O) auf pH= 2 angesäuert und mit EtOAc (3 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung (20 mL) extrahiert und mit Na_2SO_4 getrocknet. Durch Entfernen der LM unter vermindertem Druck wurde die Säure **135b** (0.74 g, 92%) als farbloses Öl erhalten; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3)¹⁶⁸: $\delta = 1.56$ – 1.60 (m, 3H, H-1), 2.20 – 2.28 (m, 2H, H-5), 2.31 – 2.37 (m, 2H, H-4), 5.29 – 5.50 (m, 2H, H-2, H-3).



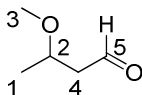
4.2.3.7 *trans*-S-(2-Acetamidoethyl) hex-4-enthiol (**73**) [CK 103]

Analog AAV 4 wurde CDI (1.74 g, 10.74 mmol) zu einer Lösung aus der Säure **135b** (1.02 g, 8.95 mmol) in absolutem CH₂Cl₂ (30 mL) unter Ar-Atmosphäre bei r.t. zugegeben. Nach 10 min Rühren wurde *N*-Acetylcysteamin (**120**) (1.28 g, 10.74 mmol) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Das LM wurde unter vermindertem Druck abdestilliert, und der Rückstand wurde in EtOAc (20 mL) gelöst. Die organische Phase wurde mit Wasser (3 x 5 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, und das LM wurde unter vermindertem Druck abdestilliert. Durch Aufreinigung mittels Säulenchromatographie (SiO₂, EtOAc, R_f=0.43) wurde der Thioester **73** (1.26 g, 65%) als wachsartiger, weißer Feststoff erhalten; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 1.61 (dd, ³J= 6.3 Hz, ²J= 1.4 Hz, 3H, H-1), 1.94 (s, 3H, H-11), 2.27 – 2.35 (m, 2H, H-4), 2.60 (t, ³J= 6.9 Hz, 2H, H-5), 3.00 (t, ³J= 6.4 Hz, 2H, H-7), 3.36 – 3.44 (m, 2H, H-8), 5.30 – 5.40 (m, 1H, H-3), 5.41 – 5.52 (m, 1H, H-2), 6.03 (br s, 1H, H-9); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ= 18.0 (C-1), 23.3 (C-11), 28.53 (C-7*), 28.54 (C-4*) 39.8 (C-8), 44.0 (C-5), 126.8 (C-2), 128.5 (C-3), 170.4 (C-10), 199.6 (C-6); MS (ESI, 10 eV, *m/z* (%)): 238.1 (100) [M+Na]⁺; HR-MS (ESI, 10 eV, *m/z*): C₁₀H₁₇NO₂SNa 238.0872 [M+Na]⁺; gemessen: 238.0877 [M+Na]⁺; IR: ν_{max}= 598, 963, 1036, 1287, 1372, 1435, 1545, 1650, 1688, 2933, 3272 cm⁻¹. * Zuordnung nicht gesichert.



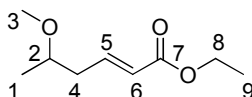
4.3.3.8 3-Methoxybutanal (**142**) [CK 144]^{110,111}

Eine Suspension aus 3-Methoxybutan-1-ol (**141**) (1.00 g, 9.60 mmol), Molekularsieb 4 Å (7.30 g), Celite® 545 (7.30 g) und Pyridiniumdichromat (PDC) (5.41 g, 14.38 mmol) in wasserfreiem CH₂Cl₂ (150 mL) wurde für 4 h bei r.t. gerührt. Nach der Zugabe von Et₂O (100 mL) und *n*-Pentan (100 mL) wurde die Suspension durch SiO₂ filtriert, und die LM wurden unter vermindertem Druck abdestilliert. Der Aldehyd **142** (0.88 g, 90%) wurde ohne weitere Aufreinigung direkt in der nächsten Stufe weiter verwendet; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 1.23 (d, ³J= 6.2 Hz, 3H, H-1), 2.48 (ddd, ²J= 16.3 Hz, ³J= 5.1 Hz, ³J= 1.9 Hz, 1H, H-4_a), 2.63 (ddd, ²J= 16.3 Hz, ³J= 7.0 Hz, ³J= 2.3 Hz, 1H, H-4_b), 3.34 (s, 3H, H-3), 3.80 – 3.90 (m, 1H, H-2), 9.79 (dd, ³J= 2.3 Hz, ³J= 1.9 Hz, 1H, H-5).



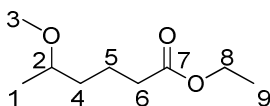
4.3.3.9 *trans*-5-Methoxyhex-2-ensäureethylester (**144**) [CK 145]¹¹²

Eine Lösung aus dem Aldehyd **142** (0.34 g, 3.33 mmol) und Ethyl-2-(triphenylphosphoranylidene)acetat (**143**) (1.28 g, 3.67 mmol) in wasserfreiem Toluol (12 mL) wurde unter Ar-Atmosphäre über Nacht bei r.t. gerührt. Nach dem Entfernen des LM unter vermindertem Druck wurde der Rückstand in *c*-Hexan (50 mL) suspendiert. Die Suspension wurde durch Celite® 545 filtriert, und das LM wurde unter vermindertem Druck abdestilliert. Aufreinigung des Rohprodukts mittels Säulenchromatographie (SiO₂, EtOAc/ *c*-Hexan, 1/3, v/v, R_f = 0.55) ergab den Ester **144** (0.45 g, 78%) als farbloses Öl; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.15 (d, ³J = 6.2 Hz, 3H, H-1), 1.27 (t, ³J = 7.1 Hz, 3H, H-9), 2.22 – 2.52 (m, 2H, H-4), 3.32 (s, 3H, H-3), 3.38 – 3.50 (m, 1H, H-2), 4.17 (q, ³J = 7.1 Hz, 2H, H-8), 5.85 (dt, ³J = 15.7 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, 1H, H-6), 6.93 (dt, ³J = 15.7 Hz, ³J = 7.3 Hz, 1H, H-5); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 14.4 (C-9), 19.2 (C-1), 39.0 (C-4), 56.3 (C-3), 60.3 (C-8), 75.7 (C-2), 123.5 (C-6), 145.3 (C-5), 166.5 (C-7); MS (ESI, 10 eV, *m/z* (%)): 195.1 (100) [M+Na]⁺; HR-MS (ESI, 10 eV, *m/z*): C₉H₁₆O₃Na 195.0992 [M+Na]⁺; gemessen: 195.0990 [M+Na]⁺; IR: ν_{max} = 1040, 1090, 1172, 1264, 1716, 2357, 2977 cm⁻¹.



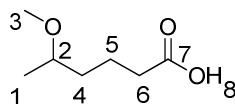
4.3.3.10 5-Methoxyhexansäureethylester (**145a**) [CK 150]⁹⁷

Eine Suspension aus dem ungesättigten Ester **144** (0.84 g, 4.94 mmol) und Palladium (0.09 g, 10% aktiviert auf Kohlenstoff) in absolutem Methanol (8 mL) wurde über Nacht unter H₂-Atmosphäre (1 bar) bei r.t. gerührt. Die Suspension wurde durch Celite® 545 filtriert, und der Filterkuchen wurde mit EtOAc (20 mL) gespült. Durch Entfernen der LM der vereinigten organischen Phasen unter vermindertem Druck wurde die Säure **145a** (0.67 g, 78%) als farbloses Öl erhalten; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.12 (d, ³J = 6.1 Hz, 3H, H-1), 1.24 (t, ³J = 7.1 Hz, 3H, H-9), 1.37 – 1.58 (m, 2H, H-4), 1.58 – 1.78 (m, 2H, H-5), 2.30 (t, ³J = 7.4 Hz, 2H, H-6), 3.14 – 3.41 (m, 4H, H-2, H-3), 4.12 (q, ³J = 7.1 Hz, 2H, H-8); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 14.4 (C-9), 19.1 (C-1), 21.1 (C-5), 35.5 (C-6), 35.8 (C-4), 56.1 (C-3), 60.4 (C-8), 76.5 (C-2), 173.8 (C-7); MS (ESI, 10 eV, *m/z* (%)): 197.1 (100) [M+Na]⁺; HR-MS (ESI, 10 eV, *m/z*): C₉H₁₈O₃Na 197.1148 [M+Na]⁺; gemessen: 197.1146 [M+Na]⁺; IR: ν_{max} = 1082, 1164, 1372, 1732, 2359, 2970 cm⁻¹.



4.3.3.11 5-Methoxyhexansäure (145b) [CK 153]

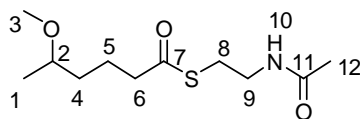
Analog AAV 2 wurde zu einer Lösung aus dem Ester **145a** (0.67 g, 3.86 mmol) in THF/ MeOH/ H₂O (2/2/1, v/v/v, 125 mL) LiOH (2.17 g, 90.61 mmol) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Nach dem Entfernen der organischen LM unter vermindertem Druck wurde die wässrige Phase mit EtOAc (2 x 15 mL) extrahiert. Anschließend wurde die wässrige Phase mit NaHSO₄ (c= 0.1 M in H₂O) auf pH= 2 angesäuert und mit EtOAc (3 x 15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung (20 mL) gewaschen und mit Na₂SO₄ getrocknet. Durch Entfernen der LM unter vermindertem Druck wurde die Säure **145b** (0.57 g, quant) als farbloses Öl erhalten; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 1.14 (d, ³J= 6.1 Hz, 3H, H-1), 1.29 – 1.83 (m, 4H, H-4, H-5), 2.37 (t, ³J= 7.3 Hz, 2H, H-6), 3.25 – 3.48 (m, 4H, H-2, H-3), 10.59 (br s, 1H, H-8); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ= 19.0 (C-1), 20.8 (C-5), 34.1 (C-6), 35.7 (C-4), 56.1 (C-3), 76.6 (C-2), 177.6 (C-7); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 145.1 (100) [M-H]⁻; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): C₇H₁₄O₃ 145.0835 [M-H]⁻; gemessen: 145.0831 [M-H]⁻; IR: ν_{max}= 1078, 1135, 1169, 1706, 2970 cm⁻¹.



4.3.3.12 S-(2-Acetamidoethyl)-5-methoxyhexanthioat (74) [CK 154]

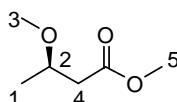
Analog AAV 4 wurde CDI (0.76 g, 4.67 mmol) zu einer Lösung aus der Säure **145b** (0.57 g, 3.89 mmol) in absolutem CH₂Cl₂ (10 mL) unter Ar-Atmosphäre bei r.t. zugegeben. Nach 10 min Rühren wurde N-Acetylcysteamin (**120**) (0.56 g, 4.67 mmol) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Das LM wurde unter vermindertem Druck abdestilliert, und der Rückstand wurde in EtOAc (20 mL) gelöst. Die organische Phase wurde mit Wasser (3x 5 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, und das LM wurde unter vermindertem Druck abdestilliert. Durch Aufreinigung mittels Säulenchromatographie (SiO₂, EtOAc, R_f=0.33) wurde der Thioester **74** (0.66 g, 69%) als wachsartiger, weißer Feststoff erhalten; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 1.11 (d, ³J= 6.1 Hz, 3H, H-1), 1.29 – 1.58 (m, 2H, H-4), 1.59 – 1.88 (m, 2H, H-5), 1.95 (s, 3H, H-12), 2.58 (t, ³J= 7.4 Hz, 2H, H-6), 3.01 (t, ³J= 6.4 Hz, 2H, H-8), 3.19 – 3.35 (m, 4H, H-2, H-3), 3.37 – 3.46 (m, 2H, H-9), 5.91 (br s, 1H, H-10); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ= 19.0 (C-1), 21.8 (C-12), 23.3 (C-5), 28.6 (C-8), 35.6 (C-4), 39.8 (C-6), 56.1 (C-3), 76.4 (C-2), 170.4 (C-11), 200.1 (C-7); MS (ESI, 10 eV,

m/z (%): 270.1 (100) $[M+Na]^+$; HR-MS (ESI, 10 ev, m/z): $C_{11}H_{21}O_3SNa$ 270.1140 $[M+Na]^+$; gemessen: 270.1142 $[M+Na]^+$; IR: ν_{\max} = 598, 1087, 1135, 1286, 1372, 1543, 1651, 1686, 2930, 3290 cm^{-1} .



4.3.3.13 (R)-3-Methoxybutansäureethylester (146a) [CK 142]¹¹³

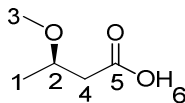
N-Butyllithium (7.83 mL, 21.13 mmol, c = 2.7 M in *n*-Heptan) wurde bei r.t. unter Ar-Atmosphäre in wasserfreies DMSO (16 mL) langsam getropft. Anschließend wurde die Säure **119a** (1.00 g, 9.61 mmol) portionsweise zugegeben, und die Reaktionslösung wurde für 2 h bei r.t. gerührt. Nach der tropfenweisen Zugabe von Methyljodid (1.44 mL, 23.05 mmol) wurde die Reaktionslösung über Nacht gerührt. Wasser (20 mL) wurde zugegeben und die Lösung wurde mit Et_2O (3 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung (2 x 10 mL) gewaschen und über $MgSO_4$ getrocknet. Nach dem Entfernen des LM unter vermindertem Druck wurde der Methylester **146a** (0.94 g, 75%) als farbloses Öl erhalten und ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.19 (d, 3J = 6.2 Hz, 3H, H-1), 2.36 (dd, 2J = 15.1 Hz, 3J = 5.7 Hz, 1H, H-4_a), 2.56 (dd, 2J = 15.1 Hz, 3J = 7.2 Hz, 1H, H-4_b), 3.32 (s, 3H, H-3), 3.67 (s, 3H, H-5), 3.76 (ddd, 3J = 7.2 Hz, 3J = 6.2 Hz, 3J = 5.7 Hz, 1H, H-2).



4.3.3.14 (R)-3-Methoxybutansäure (146b) [CK 143]

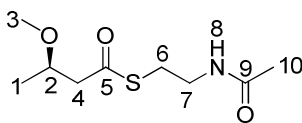
Analog AAV 2 wurde zu einer Lösung aus dem Ester **146a** (0.94 g, 7.11 mmol) in THF/ MeOH/ H_2O (2/2/1, 250 mL) LiOH (4.02 g, 167.85 mmol) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Nach dem Entfernen der organischen LM unter vermindertem Druck wurde die wässrige Phase mit EtOAc (2 x 15 mL) extrahiert. Anschließend wurde die wässrige Phase mit $NaHSO_4$ (c = 0.1 M in H_2O) auf pH = 2 angesäuert und mit EtOAc (3 x 15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung (20 mL) gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach dem Entfernen des LM unter verminderten Druck wurde die Säure **146b** (0.55 g, 65%) als farbloses Öl erhalten und ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.23 (d, 3J = 6.0 Hz, 3H, H-1), 2.45 (dd, 2J = 15.4 Hz, 3J = 5.4 Hz, 1H, H-4_a), 2.59 (dd, 2J = 15.4 Hz, 3J = 7.2 Hz, 1H, H-4_b), 3.35 (s,

3H, H-3), 3.78 (ddd, $^3J = 7.2$ Hz, $^3J = 6.0$ Hz, $^3J = 5.4$ Hz, 1H, H-2), 9.99 (br s, 1H, H-6); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 19.1$ (C-1), 41.6 (C-4), 56.5 (C-3), 73.6 (C-2), 176.9 (C-5).



4.3.3.15 (R)-S-(2-Acetamidoethyl)-3-methoxybutanthioat (75) [CK 155]

Analog AAV 4 wurde bei r.t. CDI (0.91 g, 5.61 mmol) zu einer Lösung aus der Säure **146b** (0.55 g, 4.67 mmol) in absolutem THF (10 mL) zugegeben. Nach 10 min Rühren wurde *N*-Acetylcysteamin (**120**) (0.67 g, 5.60 mmol) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Das LM wurde unter vermindertem Druck abdestilliert, und der Rückstand wurde in EtOAc (30 mL) gelöst. Die organische Phase wurde mit Wasser (3 x 5 mL) gewaschen und anschließend über Na_2SO_4 getrocknet. Nach dem Entfernen des LM unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , EtOAc, $R_f = 0.34$) aufgereinigt. Erhalten wurde der Thioester **75** (0.58 g, 57%) als weißer, wachsartiger Feststoff; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.19$ (d, $^3J = 6.1$ Hz, 3H, H-1), 1.93 (s, 3H, H-10), 2.58 (dd, $^2J = 15.1$ Hz, $^3J = 5.7$ Hz, 1H, H-4_a), 2.81 (dd, $^2J = 15.1$ Hz, $^3J = 7.2$ Hz, 1H, H-4_b), 3.01 (t, $^3J = 6.5$ Hz, 2H, H-6), 3.29 (s, 3H, H-3), 3.37 – 3.44 (m, 2H, H-7), 3.77 (ddd, $^3J = 7.2$ Hz, $^3J = 6.1$ Hz, $^3J = 5.7$ Hz, 1H, H-2), 6.05 (br s, 1H, H-8); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 19.2$ (C-1), 23.2 (C-10), 28.7 (C-6), 39.6 (C-7), 50.8 (C-4), 56.5 (C-3), 73.8 (C-2), 170.4 (C-9), 197.8 (C-5); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 242.1 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 220.1 (7) $[\text{M}+\text{H}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{NO}_3\text{S}$ 220.1007 $[\text{M}+\text{H}]^+$; gemessen: 220.0996 $[\text{M}+\text{H}]^+$; IR: $\nu_{\text{max}} = 997, 1086, 1284, 1373, 1544, 1651, 2360, 2931, 3283 \text{ cm}^{-1}$.

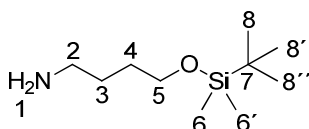


4.3.4 Substrate zur Analyse der Bacillaen KS4 Substratspezifität

4.3.4.1 4-(tert-Butyl-dimethyl-silanyloxy)-butyl-1-amin (81) [CK 15]¹²¹

Zu einer Lösung aus 4-Aminobutan-1-ol (**148**) (1.58 g, 17.74 mmol) in wasserfreiem Pyridin (12 mL) wurde bei r.t. unter Ar-Atmosphäre TBS-Cl (2.67 g, 17.74 mmol) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Nach dem Entfernen des LM unter vermindertem Druck wurde der Rückstand in CHCl_3 (40 mL) aufgenommen und mit gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lösung (3 x 20 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Na_2SO_4 wurde das LM unter vermindertem Druck abdestilliert. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromato-

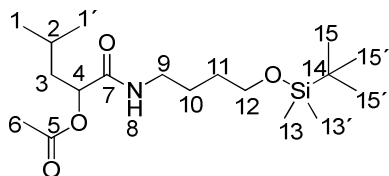
graphie (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NEt}_3$, 87.5/10.0/2.5, v/v/v, $R_f = 0.58$) aufgereinigt. Erhalten wurde der geschützte Alkohol **81** (2.99 g, 83%) als farbloses Öl; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.04$ (s, 6H, H-6, H-6'), 0.88 (s, 9H, H-8, H-8', H-8''), 1.45 – 1.61 (m, 4H, H-3, H-4), 2.18 (br s, 2H, H-1), 2.73 (t, $^3J = 6.6$ Hz, 2H, H-2), 3.62 (t, $^3J = 6.2$ Hz, 2H, H-5); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = -5.2$ (C-6, C-6'), 18.5 (C-7), 26.10 (C-8, C-8', C-8''), 29.9 (C-4), 30.3 (C-3), 42.0 (C-2), 63.2 (C-5).



4.3.4.2 4-(2-Acetoxy-4-methylpentanamido)-(O-tert-butyl-dimethyl-silanyl)-butan-1-ol (**82a**) [CK 28]

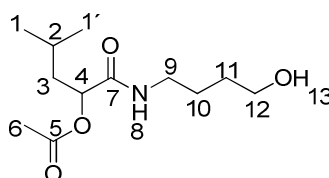
Analog AAV 1 wurden zu einer Lösung aus der Säure **80b** (1.00 g, 5.80 mmol) in wasserfreiem CH_2Cl_2 (30 mL) bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre EDC-HCl (1.34 g, 6.99 mmol) und HOBt (0.94 g, 6.96 mmol) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde für 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde eine Lösung aus dem Amin **81** (1.42 g, 6.96 mmol) in wasserfreiem CH_2Cl_2 (5 mL) und katalytische Mengen an 4-DMAP zugegeben, und die Reaktion wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit EtOAc (30 mL) verdünnt und mit gesättigter wässriger NH_4Cl -Lösung (2 x 15 mL), gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lösung (2 x 15 mL) und gesättigter wässriger NaCl -Lösung (2 x 15 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Na_2SO_4 wurde das LM unter vermindertem Druck abdestilliert. Reinigung mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , *n*-Hexan/ EtOAc, 1/1, v/v, $R_f = 0.71$) ergab das Amid **82a** (1.37 g, 83%) als farbloses Öl; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.04$ (s, 6H, H-13, H-13'), 0.88 (s, 9H, H-15, H-15', H-15''), 0.91 (d, $^3J = 6.3$ Hz, 3H, H-1*), 0.93 (d, $^3J = 6.2$ Hz, 3H, H-1*), 1.46 – 1.61 (m, 4H, H-10, H-11), 1.63 – 1.73 (m, 3H, H-2, H-3), 2.13 (s, 3H, H-6), 3.24 - 3.33 (m, 2H, H-9), 3.62 (t, $^3J = 5.8$ Hz, 2H, H-12), 5.11 – 5.20 (m, 1H, H-4), 6.08 (br t, $^3J = 5.9$ Hz, 1H, H-8); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = -5.18$ (C-13, C-13'), 18.5 (C-14), 21.1 (C-6), 22.0 (C-1*), 23.2 (C-1*), 24.7 (C-2), 26.1 (C-15, C-15', C-15''), 26.3 (C-10), 30.1 (C-11), 39.1 (C-3), 41.0 (C-9), 62.8 (C-12), 73.1 (C-4), 169.9 (C-5*), 170.3 (C-7*); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 382.3 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 360.3 (29) $[\text{M}+\text{H}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{NO}_4\text{SiNa}$ 382.2384 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gemessen: 382.2380 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR: $\nu_{\text{max}} = 834, 1100, 1225, 1655, 1746, 2857, 2955 \text{ cm}^{-1}$.

* Zuordnung nicht gesichert.



4.3.4.3 4-(2-Acetoxy-4-methylpentanamido)-butan-1-ol (**82b**) [CK 45]¹¹⁰

Eine Lösung aus dem TBS-Alkohol **82a** (0.28 g, 0.78 mmol) in wasserfreiem THF (21 mL), Pyridin (7 mL) und HF (2 mL, 70% in Pyridin) wurde für 6 h bei r.t. gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit EtOAc (30 mL) verdünnt und mit gesättigter wässriger NH₄Cl-Lösung (2 x 15 mL), HCl-Lösung (3 x 15 mL, c = 1.2 M in H₂O), gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung (3 x 15 mL) und gesättigter wässriger NaCl-Lösung (2 x 15 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Na₂SO₄ wurde das LM unter vermindertem Druck abdestilliert. Erhalten wurde der Alkohol **82b** (0.14 g, 73%) als farbloses Öl und wurde ohne weitere Aufreinigung weiter verwendet; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.90 (d, ³J = 6.2 Hz, 3H, H-1*), 0.92 (d, ³J = 6.2 Hz, 3H, H-1*), 1.53 – 1.73 (m, 7H, H-2, H-3, H-10, H-11), 2.13 (s, 3H, H-6), 2.20 (br s, 1H, H-13), 3.23 – 3.33 (m, 2H, H-9), 3.65 (t, ³J = 5.9 Hz, 2H, H-12), 5.09 – 5.17 (m, 1H, H-4), 6.37 (br t, ³J = 5.6 Hz, 1H, H-8); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 21.1 (C-6), 21.9 (C-1*), 23.2 (C-1*), 24.7 (C-2), 26.3 (C-10), 29.8 (C-11), 39.1 (C-3), 40.9 (C-9), 62.3 (C-12), 73.0 (C-4), 170.2 (C-7*), 170.6 (C-5*); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 268.2 (100) [M+Na]⁺; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): C₁₂H₂₃NO₄Na 268.1519 [M+Na]⁺; gemessen: 268.1519 [M+Na]⁺; IR: ν_{max} = 1059, 1117, 1225, 1371, 1654, 1744, 2958, 3307 cm⁻¹. * Zuordnung nicht gesichert.

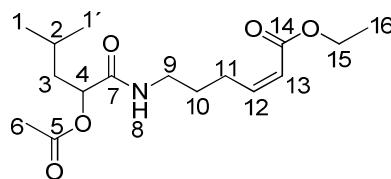


4.3.4.4 cis-6-(2-Acetoxy-4-methylpentanamido)-hex-2-ensäureethylester (**84a**) [CK 51]¹¹⁴

Zu einer Suspension aus Molekularsieb 4 Å (5.70 g), Celite® 545 (5.70 g) und dem Alkohol **82b** (1.84 g, 7.50 mmol) in wasserfreiem CH₂Cl₂ (140 mL) wurde unter Ar-Atmosphäre bei r.t. PDC (4.23 g, 11.25 mmol) zugegeben, und die Suspension wurde für 4 h bei r.t. gerührt. Die Suspension wurde durch Florisil® filtriert, und das LM des Filtrats wurde unter vermindertem Druck abdestilliert. Der Aldehyd **83** (1.82 g, quant.) wurde ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

Analog zu AAV 5 wurde zu einer Lösung aus O,O'-Bis-(2,2,2-trifluorethyl)-phosphono-essigsäureethylester (**149a**) (3.33 g, 10.01 mmol) und [18]Krone-6 (**150**) (10.22 g,

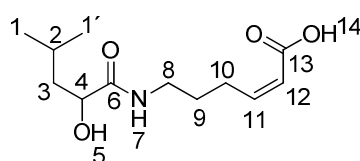
38.67 mmol) in wasserfreiem THF (32 mL) unter Ar-Atmosphäre bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ KHMDS (19.91 mL, 9.95 mmol, $c = 0.5\text{ M}$ in Toluol) langsam zugetropft, und die Reaktionslösung wurde für 30 min bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Anschließend wurde bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ eine Lösung aus dem Aldehyd **83** (1.82 g, 7.48 mmol) in wasserfreiem THF (5 mL) langsam zugetropft, und die Reaktionslösung wurde über Nacht unter Rühren auf r.t. erwärmt. Nach der Zugabe von gesättigter wässriger NH_4Cl -Lösung (20 mL) wurde die Reaktionslösung mit EtOAc (2 x 60 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (2 x 15 mL) und gesättigter wässriger NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Na_2SO_4 wurde das LM unter vermindertem Druck abdestilliert. Aufreinigung mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , EtOAc/ *n*-Hexan, 1/1, v/v, $R_f = 0.40$) ergab den Ester **84a** (0.70 g, 30%) als farbloses Öl; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.92$ (d, $^3J = 6.4\text{ Hz}$, 3H, H-1 *), 0.93 (d, $^3J = 6.1\text{ Hz}$, 3H, H-1 *), 1.28 (t, $^3J = 7.2\text{ Hz}$, 3H, H-16), $1.60 - 1.70$ (m, 5H, H-2, H-3, H-10), 2.18 (s, 3H, H-6), $2.60 - 2.69$ (m, 2H, H-11), $3.19 - 3.27$ (m, 2H, H-9), 4.15 (q, $^3J = 7.2\text{ Hz}$, 2H, H-15), $5.16 - 5.22$ (m, 1H, H-4), 5.86 (dt, $^3J = 11.6\text{ Hz}$, $^4J = 1.3\text{ Hz}$, 1H, H-13), 6.18 (dt, $^3J = 11.6\text{ Hz}$, $^3J = 8.5\text{ Hz}$, 1H, H-12), 6.92 (br t, $^3J = 5.9\text{ Hz}$, 1H, H-8); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 14.3$ (C-16), 21.1 (C-6), 21.9 (C-1 *), 23.3 (C-1 *), 24.7 (C-2), 25.6 (C-10), 27.9 (C-11), 37.3 (C-3), 41.0 (C-9), 60.2 (C-15), 72.9 (C-4), 121.3 (C-13), 148.9 (C-12), 167.0 (C-14), 170.2 (C-7 *), 170.6 (C-5 *); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 336.2 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 314.2 (62) $[\text{M}+\text{H}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{NO}_5$ 314.1962 $[\text{M}+\text{H}]^+$; gemessen: 314.1956 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR: $\nu_{\text{max}} = 1032, 1173, 1199, 1719, 2360, 2958, 3304\text{ cm}^{-1}$. * Zuordnung nicht gesichert.



4.3.4.5 *cis*-6-(2-Hydroxy-4-methylpentanamido)-hex-2-ensäure (**84b**) [CK52]

Analog AAV 2 wurde zu einer Lösung aus dem Ester **84a** (1.41 g, 4.50 mmol) in THF/ MeOH/ H_2O (2/2/1, v/v/v, 180 mL) LiOH (2.73 g, 113.06 mmol) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Nach dem Entfernen der organischen LM unter vermindertem Druck wurde die wässrige Phase mit EtOAc (2 x 15 mL) extrahiert. Anschließend wurde die wässrige Phase mit NaHSO_4 ($c = 0.1\text{ M}$ in H_2O) auf $\text{pH} = 2$ angesäuert und mit EtOAc (3 x 15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung (20 mL) gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach dem Entfernen des LM unter verminderten Druck wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 3/1, v/v, $R_f = 0.71$)

aufgereinigt, und die Säure **84b** (0.92 g, 84%) wurde als farbloses Öl erhalten; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 0.91 (d, 3J = 6.4 Hz, 3H, H-1 *), 0.92 (d, 3J = 6.1 Hz, 3H, H-1 *), 1.44 - 1.74 (m, 4H, H-3, H-9), 1.75 - 1.90 (m, 1H, H-2), 2.55 - 2.75 (m, 2H, H-10), 3.11 - 3.25 (m, 1H, H-8 $_a$), 3.28 - 3.40 (m, 1H, H-8 $_b$), 4.17 - 4.25 (m, 1H, H-4), 5.86 (d, 3J = 11.4 Hz, 1H, H-12), 6.25 (dt, 3J = 11.4 Hz, 3J = 8.2 Hz, 1H, H-11), 7.45 (br t, 3J = 5.5 Hz, 1H, H-7); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 21.5 (C-1 *), 23.5 (C-1 *), 24.6 (C-2), 25.9 (C-9), 28.1 (C-10), 38.0 (C-3), 43.6 (C-8), 70.9 (C-4), 121.1 (C-12), 150.0 (C-11), 170.0 (C-13), 176.4 (C-6); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 242.1 (100) $[\text{M-H}]^-$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{NO}_4$ 242.1387 $[\text{M-H}]^-$; gemessen: 242.1382 $[\text{M-H}]^-$; IR: ν_{max} = 1176, 1210, 1540, 1636, 1697, 2341, 2359, 2955, 3324 cm^{-1} . * Zuordnung nicht gesichert.

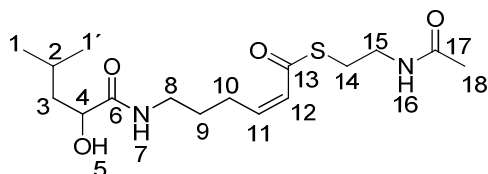


4.3.4.6 *cis-S*-(2-Acetamidoethyl)-6-(2-hydroxy-4-methylpentanamido)hex-2-enthioat (**76**) [CK 67]

Analog zu AAV 3 wurde bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre zu einer Lösung aus der Säure **84b** (0.916 g, 3.77 mmol) in wasserfreiem CH_2Cl_2 (40 mL) EDC-HCl (0.87 g, 4.52 mmol) und HOBt (0.68 g, 4.52 mmol) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde für 30 min bei 0°C gerührt. Anschließend wurden *N*-Acetylcysteamin (**120**) (0.90 g, 4.52 mmol) und katalytische Mengen an 4-DMAP zugegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Nach der Zugabe von gesättigter wässriger NH_4Cl -Lösung (10 mL) wurden die Phasen getrennt, und die wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen und anschließend über Na_2SO_4 getrocknet. Nach dem Abdestillieren des LM unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO_2 , EtOAc, R_f = 0.09) gereinigt. Es wurde ein Gemisch aus der Zielverbindung **76** und dem Edukt **84b** erhalten, das mittels HPLC (Knauer Eurospher II 100 RP-18, Methanol/ Wasser + 1 Vol% Trifluoressigsäure (TFA), 55/ 45, 16.0 mL/min) weiter aufgereinigt wurde. Erhalten wurde der Thioester **76** (0.13 g, 20%) als weißer, wachsartiger Feststoff; t_R = 9.24 min; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 0.95 (d, 3J = 6.3 Hz, 6H, H-1, H-1 *), 1.46 - 1.78 (m, 4H, H-3, H-9), 1.80 - 1.93 (m, 1H, H-2), 1.97 (s, 3H, H-18), 2.55 - 2.75 (m, 2H, H-10), 2.96 - 3.17 (m, 2H, H-14), 3.21 - 3.35 (m, 2H, H-8), 3.37 - 3.50 (m, 2H, H-15), 4.00 (br s, 1H, H-5), 4.10 - 4.21 (m, 1H, H-4), 5.99 - 6.19 (m, 2H, H-11, H-12), 6.28 (br s, 1H, H-16 *), 7.16 (br s, 1H, H-7 *); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 21.5 (C-1 *), 23.3 (C-18), 23.7 (C-1 *), 24.7 (C-2), 27.0 (C-10), 28.4 (C-14), 28.7 (C-9), 38.0 (C-8), 39.6

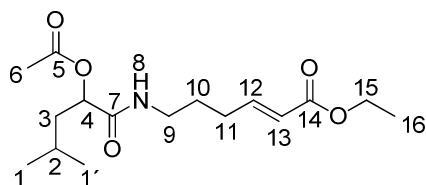
(C-15), 43.9 (C-3), 70.8 (C-4), 127.2 (C-12), 146.2 (C-11), 171.0 (C-17), 175.4 (C-6), 190.4 (C-13); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 367.2 (100) $[M+Na]^+$, 345.2 (8) $[M+H]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $C_{16}H_{28}N_2O_4SNa$ 367.1662 $[M+Na]^+$; gemessen: 367.1672 $[M+Na]^+$; IR: ν_{\max} = 1138, 1201, 1411, 1424, 1468, 1539, 1633, 1658, 2341, 2360, 2922, 3357 cm^{-1} .

* Zuordnung nicht gesichert.



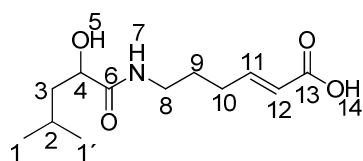
4.3.4.7 *trans*-6-(2-Acetoxy-4-methylpentanamido)-hex-2-ensäureethylester (**156a**) [CK 224]¹¹⁸

Oxalylchlorid (0.97 mL, 11.31 mmol) wurde bei -78 °C unter Ar-Atmosphäre zu einer Lösung aus DMSO (1.24 mL, 17.46 mmol) in absolutem CH_2Cl_2 (14 mL) langsam zugetropft, und die Reaktionslösung wurde für 15 min bei -78 °C gerührt. Anschließend wurde bei -78 °C eine Lösung aus dem Alkohol **82b** (1.40 g, 5.72 mmol) in absolutem CH_2Cl_2 (2 mL) langsam zugetropft, und die Reaktionslösung wurde für 1 h bei -78 °C gerührt. Et_3N (3.33 mL, 24.02 mmol) wurde langsam zugegeben, und die Reaktionslösung wurde auf r.t. erwärmt. Nach der Zugabe von Ethoxycarbonylmethylentriphenylphosphoran (**143a**) (3.98 g, 11.42 mmol) wurde die Reaktionslösung über Nacht bei r.t. gerührt. Die Reaktionslösung wurde durch Celite® 545 filtriert, und der Filterkuchen wurde mit EtOAc/ *c*-Hexan (50 mL, 1/9, v/v) gewaschen. Die LM der vereinigten organischen Phasen wurden unter vermindertem Druck entfernt, und das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , EtOAc/ *c*-Hexan, 4/6, v/v, R_f = 0.33) aufgereinigt. Erhalten wurde der Ethylester **156a** (0.28 g, 16%) als farbloses Öl; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 0.89 (d, 3J = 6.2 Hz, 3H, H-1*), 0.91 (d, 3J = 6.2 Hz, 3H, H-1*), 1.26 (t, 3J = 7.1 Hz, 3H, H-16), 1.57 – 1.79 (m, 5H, H-2, H-3, H-10), 2.11 (s, 3H, H-6), 2.13 – 2.25 (m, 2H, H-11), 3.12 – 3.40 (m, 2H, H-9), 4.15 (q, 3J = 7.1 Hz, 2H, H-15), 5.06 – 5.20 (m, 1H, H-4), 5.81 (dt, 3J = 15.6 Hz, 4J = 1.5 Hz, 1H, H-13), 6.14 (br s, 1H, H-8), 6.90 (dt, 3J = 15.6 Hz, 3J = 6.9 Hz, 1H, H-12); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.3 (C-16), 21.0 (C-6), 21.9 (C-1*), 23.2 (C-1*), 24.6 (C-2), 28.1 (C-10), 29.5 (C-11), 38.7 (C-3), 40.9 (C-9), 60.3 (C-15), 73.0 (C-4), 122.2 (C-13), 147.7 (C-12), 166.6 (C-14), 170.0 (C-7*), 170.4 (C-5*); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 336.2 (100) $[M+Na]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $C_{16}H_{27}NO_5Na$ 336.1781 $[M+Na]^+$; gemessen: 336.1771 $[M+Na]^+$; IR: ν_{\max} = 1044, 1170, 1236, 1540, 1655, 1718, 2341, 2958, 3295 cm^{-1} . * Zuordnung nicht gesichert.



4.3.4.8 **trans-6-(2-Hydroxy-4-methylpentanamido)-hex-2-ensäure (156b)** [CK 237]¹⁰³

LiOH (0.11 g, 4.59 mmol) wurde bei 0 °C portionsweise zu einer Lösung aus dem Ester **156a** (0.28 g, 0.89 mmol) in Wasser (1 mL) und MeOH (3 mL) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde für 2 h bei r.t. gerührt. Das LM wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in EtOAc (20 mL) gelöst und mit gesättigter wässriger NH₄Cl (10 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit HCl (c= 1 M in H₂O) auf pH= 2 angesäuert und mit EtOAc (3 x 10 mL) extrahiert. Nach dem Trocknen der vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ wurde das LM unter vermindertem Druck entfernt. Reinigung des Rohprodukts mittels Säulenchromatographie (SiO₂, EtOAc + 1 Vol% AcOH, R_f= 0.41) ergab die Säure **156b** (0.19 g, 75%) als farbloses Öl; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 0.94 (d, ³J= 6.5 Hz, 3H, H-1*), 0.95 (d, ³J= 6.4 Hz, 3H, H-1*), 1.48 – 1.95 (m, 5H, H-2, H-3, H-9), 2.21 – 2.36 (m, 2H, H-10), 3.23 – 3.37 (m, 2H, H-8), 4.10 – 4.19 (m, 1H, H-4), 5.85 (d, ³J= 15.7 Hz, 1H, H-12), 6.78 (br t, ³J= 5.6 Hz, 1H, H-7), 7.02 (dt, ³J= 15.7 Hz, ³J= 6.9 Hz, 1H, H-11); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ= 21.5 (C-1*), 23.6 (C-1*), 24.7 (C-2), 28.1 (C-9), 29.8 (C-10), 38.7 (C-3), 43.9 (C-8), 71.0 (C-4), 121.4 (C-12), 150.5 (C-11), 170.5 (C-13), 175.1 (C-6); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 242.1 (100) [M-H]⁻; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): C₁₂H₂₀NO₄ 242.1398 [M-H]⁻; gemessen: 242.1387 [M-H]⁻; IR: ν_{max}= 1217, 1228, 1366, 1541, 1648, 1702, 2955, 3325 cm⁻¹.
* Zuordnung nicht gesichert.

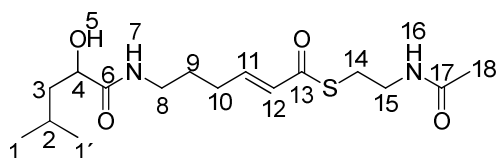


4.3.4.9 **trans-S-(2-Acetamidoethyl)-6-(2-hydroxy-4-methylpentanamido)hex-2-enthioat (77)** [CK 240]

Analog zu AAV 3 wurde bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre zu einer Lösung aus der Säure **156b** (0.19 g, 0.79 mmol) in wasserfreiem CH₂Cl₂ (10 mL) EDC-HCl (0.18 g, 0.95 mmol) und HOBt (0.15 g, 0.95 mmol) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde für 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde N-Acetylcysteamin (**120**) (0.11 g, 0.95 mmol) und katalytische Mengen an 4-DMAP zugegeben, und die Reaktionslösung

wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Nach der Zugabe von gesättigter wässriger NH_4Cl -Lösung (10 mL) wurden die Phasen getrennt, und die wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen und anschließend über Na_2SO_4 getrocknet. Nach dem Abdestillieren des LM unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt mittels HPLC (Knauer Eurospher II 100 RP-18 Methanol/ Wasser + 1 Vol% TFA, 55/ 45, 16.0 mL/min weiter aufgereinigt. Erhalten wurde der Thioester **77** (0.02 g, 7%) als weißer, wachsartiger Feststoff; $t_R=7.53$ min; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta=0.94$ (d, $^3J=6.5$ Hz, 3H, H-1 *), 0.95 (d, $^3J=6.7$ Hz, 3H, H-1 *), 1.45 – 1.55 (m, 1H, H-3 $_a$ *) 1.57 – 1.77 (m, 3H, H-3 $_b$, H-9), 1.77 – 1.91 (m, 1H, H-2), 1.96 (s, 3H, H-18), 2.20 – 2.31 (m, 2H, H-10), 3.08 (t, $^3J=6.3$ Hz, 2H, H-14), 3.26 – 3.35 (m, 2H, H-8), 3.40 – 3.49 (m, 2H, H-15), 3.63 (br s, 1H, H-5), 4.09 – 4.17 (m, 1H, H-4), 6.14 (dt, $^3J=15.5$ Hz, $^4J=1.3$ Hz, 1H, H-12), 6.20 (br s, 1H, H-16 *), 6.81 (br s, 1H, H-7 *), 6.89 (dt, $^3J=15.5$ Hz, $^3J=7.0$ Hz, 1H, H-11); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta=21.5$ (C-1 *), 23.3 (C-18), 23.7 (C-1 *), 24.7 (C-2), 27.0 (C-10), 28.4 (C-14), 28.7 (C-9), 38.0 (C-8), 39.6 (C-15), 43.9 (C-3), 70.8 (C-4), 127.2 (C-12), 146.2 (C-11), 171.0 (C-17), 175.4 (C-6), 190.4 (C-13); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 367.2 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 345.2 (9) $[\text{M}+\text{H}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ 345.1843 $[\text{M}+\text{H}]^+$; gemessen: 345.1840 $[\text{M}+\text{H}]^+$; IR: $\nu_{\text{max}}=1140, 1203, 1367, 1541, 1655, 1738, 2361, 2954, 3292\text{ cm}^{-1}$.

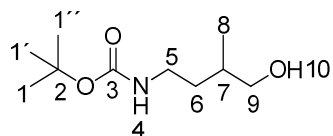
* Zuordnung nicht gesichert.



4.3.4.10 4-N-(tert-Butyloxycarbonyl)-2-methylbutanol (**160c**) [CK 227]¹²⁴

Di-*tert*-butyldicarbonat (Boc_2O) (5.56 g, 25.48 mmol) wurde zu einer Lösung aus dem Amin **160a** (2.50 g, 24.23 mmol) in THF (42 mL) gegeben, und die Reaktionslösung wurde für 1 h bei r.t. gerührt. Nachdem das LM unter vermindertem Druck abdestilliert wurde, wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO_2 , EtOAc/ *c*-Hexan, 4/6, v/v, $R_f=0.33$) aufgereinigt. Erhalten wurde das geschützte Amin **160c** (4.91 g, quant.) als farbloses Öl; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta=0.94$ (d, $^3J=6.7$ Hz, 3H, H-8), 1.30 – 1.39 (m, 1H, H-7), 1.44 (s, 9H, H-1, H-1', H-1''), 1.55 – 1.75 (m, 2H, H-6), 3.13 (ddd, $^2J=13.5$ Hz, $^3J=8.1$ Hz, $^3J=6.6$ Hz, 1H, H-5 $_a$), 3.23 (ddd, $^2J=13.5$ Hz, $^3J=8.1$ Hz, $^3J=6.3$ Hz, 1H, H-5 $_b$), 3.49 (dd, $^3J=6.0$ Hz, $^3J=1.3$ Hz, 2H, H-9); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta=16.8$ (C-8), 28.6 (C-1, C-1', C-1''), 33.5 (C-7), 33.9 (C-6), 38.7 (C-5), 68.1 (C-9), 79.4 (C-2), 156.3 (C-3); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 226.2 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV,

m/z : $C_{10}H_{21}NO_3Na$ 226.1414 $[M+Na]^+$; gemessen: 226.1417 $[M+Na]^+$; IR: ν_{\max} = 1042, 1168, 2365, 1522, 1684, 2359, 2929, 3337 cm^{-1} .



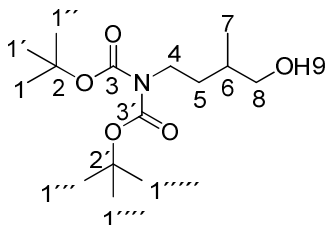
4.3.4.11 4-N-(Di-tert-butylloxycarbonyl)-2-methylbutan-1-ol (**160d**) [CK 300]¹²⁵

TBS-Cl (2.67 g, 17.72 mmol) wurde bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre portionsweise zu einer Lösung aus Imidazol (2.51 g, 36.89 mmol) und dem Alkohol **160c** (3.00 g, 14.76 mmol) in absolutem CH_2Cl_2 (60 mL) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde für 2 h bei 0 °C gerührt. Nach der Zugabe von Et_2O (120 mL) wurde die Lösung mit Wasser (2 x 20 mL) und gesättigter, wässriger NaCl-Lösung (2 x 20 mL) gewaschen, und die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet. Nach dem Entfernen der LM unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt als farbloses Öl erhalten und ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet.

Zu einer Lösung aus dem geschützten Alkohol (4.68 g, 14.75 mmol) in absolutem THF (65 mL) wurde bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre *n*-Buthyllithium (7.10 mL, 17.74 mmol, $c = 2.5$ M in *n*-Hexan) zugetropft, und die Reaktionslösung wurde für 15 min bei 0 °C. Anschließend wurde eine Lösung aus Di-*tert*-butyldicarbonat (3.87 g, 17.74 mmol) in absolutem THF (25 mL) bei 0 °C zugetropft, und die Reaktionslösung wurde für 1 h bei r.t. gerührt. Nach der Zugabe von Et_2O (150 mL) wurde die Lösung mit Wasser (2 x 30 mL) und gesättigter wässriger NaCl-Lösung (2 x 30 mL) gewaschen, und die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet. Nach dem Entfernen der LM unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt als farbloses Öl erhalten und ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet.

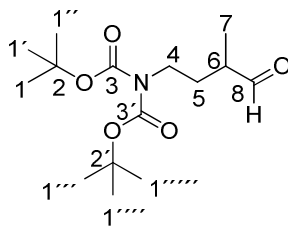
Tetra-*n*-butylammoniumfluorid (TBAF) (21.5 mL, 21.50 mmol, $c = 1$ M in THF) wurde bei r.t. zu einer Lösung aus dem geschützten Alkohol (5.98 g, 14.31 mmol) in THF (40 mL) zugetropft, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Nach der Zugabe von Et_2O (100 mL) wurde die Lösung mit Wasser (2 x 30 mL) und gesättigter wässriger NaCl-Lösung (2 x 30 mL) gewaschen, und die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet. Nach dem Entfernen der LM unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , EtOAc/ *c*-Hexan, 2/3, v/v, $R_f = 0.53$) aufgereinigt. Erhalten wurde der Alkohol **160d** (2.60 g, 58%) als farbloses Öl, 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 0.86 (d, $^3J = 6.7$ Hz, 3H, H-7), 1.32 – 1.39 (m, 1H, H-5_a), 1.41 (s, 18H, H-1, H-1', H-1'', H-1''', H-1''', H-1'''''), 1.52 – 1.64 (m, 3H, H-5_b, H-6,

H-9), 3.40 (d, $^3J = 5.8$ Hz, 2H, H-8), 3.44 – 3.59 (m, 2H, H-4); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 16.8$ (C-7), 28.2 (C-1, C-1', C-1'', C-1''', C-1''', C-1'''), 32.5 (C-5), 33.7 (C-6), 44.6 (C-4), 68.0 (C-8), 82.4 (C-2, C-2'), 152.9 (C-3, C-3'); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 326.2 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{NO}_5\text{Na}$ 326.1938 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gemessen: 326.1943 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR: $\nu_{\text{max}} = 1114, 1236, 1630, 1730, 2360, 2977 \text{ cm}^{-1}$.



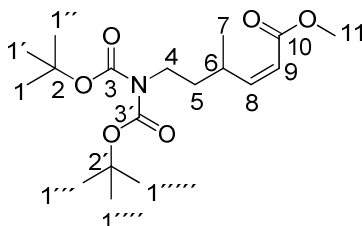
4.3.4.12 4-N-(Di-tert-butyloxycarbonyl)-2-methylbutanal (166) [CK 304]¹²⁵

Eine Lösung aus DMSO (0.70 mL, 9.85 mmol) in absolutem CH_2Cl_2 (5 mL) wurde bei -78°C unter Ar-Atmosphäre zu einer Lösung aus Oxalylchlorid (0.43 mL, 4.91 mmol) in absolutem CH_2Cl_2 (18 mL) langsam zugetropft, und die Reaktionslösung wurde 5 min bei -78°C gerührt. Anschließend wurde bei -78°C eine Lösung aus dem Alkohol **160d** (0.50 g, 1.65 mmol) in absolutem CH_2Cl_2 (5 mL) langsam zugetropft, und die Reaktionslösung wurde für weitere 40 min bei -78°C gerührt. Nach der tropfenweisen Zugabe von Et_3N (2.05 mL, 14.73 mmol) bei -78°C wurde die Reaktionslösung für 1 h bei 0°C gerührt. Wasser (10 mL) und anschließend Et_2O (100 mL) wurden zur Reaktionslösung zugegeben, und die Phasen wurden separiert. Die organische Phase wurde mit Wasser (2 x 20 mL) und gesättigter, wässriger NaCl-Lösung (2 x 10 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Na_2SO_4 wurden die LM unter vermindertem Druck entfernt. Aufreinigung des Rohprodukts mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , $\text{EtOAc}/c\text{-Hexan}$, 1/4, v/v, $R_f = 0.57$) ergab den Aldehyd **166** (0.41 g, 83%) als farbloses Öl; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.14$ (d, $^3J = 7.1$ Hz, 3H, H-7), 1.50 (s, 18H, H-1, H-1', H-1'', H-1''', H-1''', H-1'''), 1.54 – 1.68 (m, 1H, H-5_a), 1.96 – 2.09 (m, 1H, H-5_b), 2.32 – 2.41 (m, 1H, H-6), 3.62 (dd, $^3J = 7.5$ Hz, $^3J = 7.5$ Hz, 2H, H-4), 9.64 (d, $^4J = 1.5$ Hz, 1H, H-8); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 13.5$ (C-7), 28.2 (C-1, C-1', C-1'', C-1''', C-1''', C-1'''), 29.7 (C-5), 44.2 (C-6), 44.3 (C-4), 68.0 (C-8), 82.6 (C-2, C-2'), 152.7 (C-3, C-3'), 204.1 (C-8); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 324.2 (45) $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{NO}_5\text{Na}$ 324.1781 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gemessen: 324.1785 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR: $\nu_{\text{max}} = 1118, 1284, 1366, 1697, 1781, 2342, 2359, 2978 \text{ cm}^{-1}$.



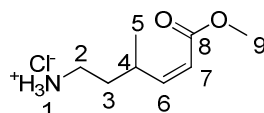
4.3.4.13 *cis*-6-((*Di*-*tert*-*butoxycarbonyl*)*amino*)-4-methylhex-2-ensäuremethylester (**167a**) [CK 305]

Analog zu AAV 5 wurde bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Ar-Atmosphäre zu einer Lösung aus *O,O'*-Bis-(2,2,2-trifluorethyl)-phosphono-essigsäuremethylester (**149b**) (0.43 mL, 2.03 mmol) und [18]Krone-6 (**150**) (1.86 g, 7.05 mmol) in wasserfreiem THF (10 mL) KHMDS (4.05 mL, 2.02 mmol, $c = 0.5\text{ M}$ in Toluol) langsam zugetropft, und die Reaktionslösung wurde für 30 min bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Anschließend wurde bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ eine Lösung aus dem Aldehyd **166** (0.41 g, 1.36 mmol) in wasserfreiem THF (2 mL) langsam zugetropft, und die Reaktionslösung wurde über Nacht unter Rühren auf r.t. erwärmt. Nach der Zugabe von gesättigter wässriger NH_4Cl -Lösung (10 mL) wurde die Reaktionslösung mit EtOAc (2 x 40 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (2 x 15 mL) und gesättigter wässriger NaCl-Lösung (2 x 15 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase mit Na_2SO_4 wurden die LM unter vermindertem Druck abdestilliert. Aufreinigung mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , EtOAc/ *c*-Hexan, 1/1, v/v, $R_f = 0.53$) ergab den Ester **167a** (0.41 g, 84%, *E/Z* = 1/9) als farbloses Öl; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.04$ (d, $^3J = 6.7\text{ Hz}$, 3H, H-7), 1.49 (s, 18H, H-1, H-1', H-1'', H-1''', H-1''', H-1'''''), 1.57 – 1.74 (m, 2H, H-5), 3.40 – 3.61 (m, 3H, H-4, H-6), 3.70 (s, 3H, H-11), 5.74 (dd, $^3J = 11.5\text{ Hz}$, $^4J = 0.8\text{ Hz}$, 1H, H-9), 6.00 (dd, $^3J = 11.5\text{ Hz}$, $^3J = 10.2\text{ Hz}$, 1H, H-8); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 20.5$ (C-7), 28.2 (C-1, C-1', C-1'', C-1''', C-1''', C-1'''''), 31.0 (C-6), 36.0 (C-5), 45.0 (C-4), 51.2 (C-11), 82.3 (C-2, C-2'), 118.7 (C-9), 152.6 (C-3, C-3'), 155.0 (C-8), 166.7 (C-10); MS (ESI, 10 eV, *m/z* (%)): 380.2 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, *m/z*): $\text{C}_{18}\text{H}_{31}\text{NO}_6\text{Na}$ 380.2044 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gemessen: 380.2026 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR: $\nu_{\text{max}} = 1116, 1174, 1366, 1693, 1721, 2341, 2359, 2978\text{ cm}^{-1}$.



4.3.4.14 *cis*-6-Amino-4-methylhex-2-ensäuremethylester Hydrochlorid (**167b**) [CK 329]¹⁰⁰

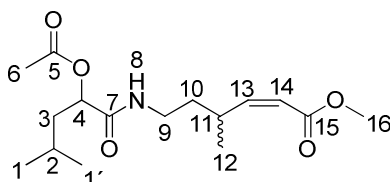
Eine Lösung aus dem geschützten Amin **167a** (0.72 g, 2.00 mmol) in verdünnter Salzsäure (4 mL, $c = 4$ M in 1,4-Dioxan) wurde für 2 h bei r.t. gerührt. Entfernen des LM unter vermindertem Druck und Trocknung des Rückstands über Nacht unter Hochvakuum ergab den 6-Aminoester **167b** (0.35 g, 90%) als weißen Feststoff; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.01$ (d, $^3J = 6.5$ Hz, 3H, H-5), 1.57 – 1.70 (m, 1H, H-3_a), 1.91 – 2.08 (m, 1H, H-3_b), 2.77 – 3.12 (m, 2H, H-2), 3.41 – 3.58 (m, 1H, H-4), 3.66 (s, 3H, H-9), 8.04 – 8.42 (br m, 3H, H-1); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 20.7$ (C-5), 30.1 (C-4), 33.8 (C-3), 38.2 (C-2), 51.6 (C-9), 119.9 (C-7), 153.3 (C-6), 167.4 (C-8); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 158.1 (53) $[\text{M}+\text{H}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{NO}_2$ 158.1176 $[\text{M}+\text{H}]^+$; gemessen: 158.1172 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR: $\nu_{\text{max}} = 1178, 1199, 1716, 2359, 2952 \text{ cm}^{-1}$.



4.3.4.15 *cis*-6-(2-Acetoxy-4-methylpentanamido)-4-methylhex-2-ensäuremethylester (**168a**) [CK 332]¹²⁶

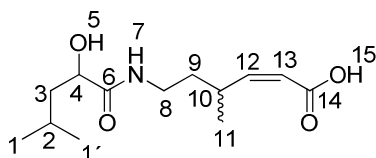
Zu einer Lösung aus der Säure **80b** (0.18 g, 1.03 mmol) in absolutem CH_2Cl_2 (5 mL) wurde bei r.t. unter Ar-Atmosphäre Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphat (PyBop) (0.54 g, 1.03 mmol), eine Lösung aus dem Amin **167b** (0.20 g, 1.03 mmol) in wasserfreiem CH_2Cl_2 (1 mL) und Diisopropylamin (0.50 mL, 2.84 mmol) zugegeben. Nach dem Rühren der Reaktionslösung über Nacht bei r.t. wurde EtOAc (50 mL) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde mit gesättigter wässriger NH_4Cl -Lösung (2 x 10 mL), gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lösung (2 x 10 mL), Wasser (2 x 10 mL) und gesättigter wässriger NaCl -Lösung (1 x 10 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über MgSO_4 wurde das LM unter vermindertem Druck entfernt. Aufreinigung des Rohprodukts mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , EtOAc/ *c*-Hexan, 4/6, $R_f = 0.46$) ergab das Amid **168a** (0.17 g, 51%) als farbloses Öl in zwei Diastereomeren; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.92$ (d, $^3J = 5.6$ Hz, 6H, H-1, H-1'), 0.98 und 1.01 (d, $^3J = 6.6$ Hz, 3H, H-12), 1.19 – 1.44 (m, 1H, H-10_a*), 1.56 – 1.79 (m, 4H, H-2*, H-3*, H-10_b*), 2.19 und 2.20 (s, 3H, H-6), 2.63 – 2.83 (m, 1H, H-11), 3.33 – 3.67 (m, 2H, H-9), 3.68 und 3.70 (s, 3H, H-16), 5.14 – 5.26 (m, 1H, H-4), 5.81 (d, $^3J = 11.5$ Hz, 1H, H-14), 5.90 (dd, $^3J = 11.5$, $^3J = 10.0$ Hz, 1H, H-13), 7.08 – 7.25 (br s, 1H, H-8); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 21.05$ und 21.06 (C-1*), 21.07 und 21.13 (C-12*), 21.8 und 21.9 (C-6), 23.3 (C-1*), 24.67 und 24.72

(C-2), 30.07 und 30.09 (C-11), 36.1 und 36.2 (C-10), 36.4 und 36.6 (C-3), 40.98 und 41.00 (C-9), 51.45 und 51.47 (C-16), 72.7 und 72.9 (C-4), 119.1 und 119.2 (C-14), 155.1 und 155.3 (C-13), 167.70 und 167.02 (C-15), 170.1 und 170.3 (C-5^{*}), 170.4 und 170.5 (C-7^{*}); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 336.2 (100) $[M+Na]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $C_{16}H_{28}NO_5$ 314.1962 $[M+H]^+$; gemessen: 314.1961 $[M+H]^+$; IR: ν_{\max} = 1178, 1220, 1532, 1654, 1723, 2362, 2957 cm^{-1} . * Zuordnung nicht gesichert.



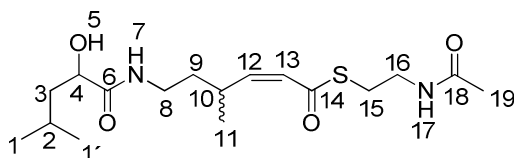
4.3.4.15 *cis*-6-(2-Acetoxy-4-methylpentanamido)-4-methylhex-2-ensäure (168b) [CK 334]

Analog AAV 2 wurde zu einer Lösung aus dem Methylester **168a** (0.17 g, 0.53 mmol) in THF/ MeOH/ H₂O (2:2:1, v/v/v, 21 mL) LiOH (0.32 g, 13.36 mmol) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Nach dem Entfernen der organischen LM unter vermindertem Druck wurde die wässrige Phase mit EtOAc (2 x 15 mL) extrahiert. Anschließend wurde die wässrige Phase mit NaHSO₄ (c= 0.1 M in H₂O) auf pH= 2 angesäuert und mit EtOAc (3 x 15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung (20 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach dem Entfernen des LM unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (SiO₂, EtOAc + 1 Vol% AcOH, v/v, R_f= 0.63) aufgereinigt und die Säure **168b** (0.92 g, 84%) wurde als farbloses Öl in zwei Diastereomeren erhalten; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.92 (m, 6H, H-1, H-1'), 0.99 und 1.02 (d, ³J= 6.6 Hz, 3H, H-11), 1.27 – 1.70 (m, 4H, H-3, H-9), 1.73 – 1.90 (m, 1H, H-2), 2.80 – 3.09 (m, 1H, H-10), 3.41 – 3.71 (m, 2H, H-8), 5.14 – 5.26 (m, 1H, H-4), 5.83 (dd, ³J= 11.5 Hz, ⁴J= 2.2 Hz 1H, H-13), 5.90 (m, 1H, H-12), 7.48 – 7.66 (br m, 1H, H-7); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 20.6 und 20.8 (C-1^{*}), 21.45 und 21.50 (C-11), 23.5 und 23.6 (C-1^{*}), 24.65 und 24.68 (C-2), 29.88 und 29.94 (C-10), 36.0 und 36.1 (C-9), 36.69 und 36.71 (C-3), 43.6 und 43.7 (C-8), 70.8 und 70.9 (C-4), 119.4 und 119.6 (C-13), 155.4 und 156.0 (C-12), 170.1 und 170.2 (C-14), 176.4 und 176.5 (C-6); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 256.2 (100) $[M-H]^-$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $C_{13}H_{22}NO_4$ 256.1554 $[M-H]^-$; gemessen: 256.1550 $[M-H]^-$; IR: ν_{\max} = 1189, 1541, 1636, 1698, 2341, 2359, 2957, 3351 cm^{-1} . * Zuordnung nicht gesichert.



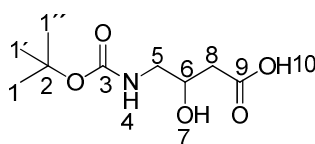
4.3.4.16 cis-S-(2-Acetamidoethyl)-6-(2-hydroxy-4-methylpentanamido)-4-methyl-hex-2-enthioat (**78**) [CK 341]

Zu einer Lösung aus der Säure **168b** (0.19 g, 0.73 mmol), HOBT (0.13 g, 0.88 mmol), *N*-Acetylcysteamin (**120**) (0.10 g, 0.88 mmol) und katalytische Mengen an 4-DMAP in wasserfreiem CH₂Cl₂ (10 mL) wurde bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre eine Lösung aus EDC-HCl (0.17 g, 0.88 mmol) in wasserfreiem CH₂Cl₂ (2 mL) langsam zugetropft, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Nach der Zugabe von EtOAc (20 mL) wurde die Reaktionslösung mit gesättigter wässriger NH₄Cl-Lösung (10 mL), gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung (10 mL), Wasser (10 mL) und gesättigter wässriger NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über MgSO₄ wurde das LM unter vermindertem Druck abdestilliert. Das Rohprodukt wurde zunächst mittels Säulenchromatographie (Florisil®, EtOAc, R_f = 0.10) vorgereinigt. Weitere Aufreinigung mittels HPLC (Knauer Eurospher 100 RP C-18, MeOH/ H₂O + 1 Vol% TFA, 55/45, 1 mL/min) ergab den Thioester **78** (0.13 g, 20%) als wachsartigen, weißen Feststoff in zwei Diastereomeren; t_R = 17.09 und 18.67 min; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.93 und 0.94 (d, ³J = 6.6 Hz, 6H, H-1, H-1'), 1.01 (d, ³J = 6.6 Hz, 3H, H-11), 1.36 – 1.69 (m, 4H, H-3, H-9), 1.82 – 1.92 (m, 1H, H-2), 1.93 und 1.94 (s, 3H, H-19), 2.88 – 3.04 (m, 2H, H-15), 3.06 – 3.23 (m, 1H, H-10), 3.35 – 3.56 (m, 4H, H-8, H-16), 4.08 – 4.15 (m, 2H, H-4, H-5), 5.77 (ddd, ³J = 11.2 Hz, ³J = 10.4 Hz, ³J = 5.7 Hz, 1H, H-12), 6.08 (ddd, ³J = 11.2 Hz, ⁴J = 1.9 Hz, ⁴J = 0.7 Hz, 1H, H-13), 6.34 – 6.48 (br m, 1H, H-17), 7.25 und 7.34 (br t, ³J = 5.4 Hz, 1H, H-7); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 20.6 und 20.7 (C-1*), 21.46 und 21.47 (C-11*), 23.2 (C-19), 23.7 (C-1*), 24.61 und 24.64 (C-2), 28.7 und 28.8 (C-15), 31.2 und 31.3 (C-10), 36.46 und 36.48 (C-9*), 36.6 und 36.9 (C-3*), 39.3 und 39.4 (C-16), 43.81 und 43.82 (C-8), 70.7 und 70.8 (C-4), 125.7 und 125.8 (C-13), 152.0 und 152.1 (C-12), 170.9 und 171.0 (C-18), 175.2 und 175.3 (C-6), 190.56 und 190.64 (C-14); MS (ESI, 10 eV, *m/z* (%)): 381.2 (100) [M+Na]⁺; HR-MS (ESI, 10 eV, *m/z*): C₁₇H₃₀N₂O₄SNa 381.1818 [M+Na]⁺; gemessen: 381.1813 [M+Na]⁺; IR: ν_{max} = 1104, 1191, 1301, 1428, 1531, 1647, 2360, 2983, 3012, 3293 cm⁻¹. * Zuordnung nicht gesichert.



4.3.4.17 4-((tert-Butoxycarbonyl)amino)-3-hydroxybutansäure (**178b**) [CK 254]¹³⁸

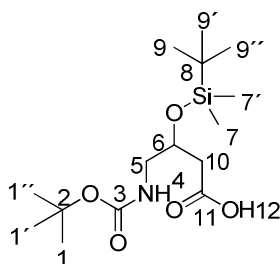
Zu einer Lösung aus 4-Amino-3-hydroxybutansäure (**178a**) (5.00 g, 42.00 mmol) und NaOH (1.70 g, 42.0 mmol) in Wasser (50 mL) und MeOH (125 mL) wurde bei r.t. portionsweise Boc_2O (9.16 g, 42.00 mmol) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde für 3 h bei r.t. gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C gekühlt und mit verdünnter HCl ($c = 2 \text{ M}$ in H_2O) auf pH= 2 angesäuert. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit EtOAc (3 x 150 mL) extrahiert, und die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung (2 x 30 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über MgSO_4 wurde das LM unter vermindertem Druck abdestilliert. Die geschützte Säure **178b** (8.73 g, 95%) wurde als farbloses Öl erhalten und ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.45$ (s, 9H, H-1, H-1', H-1''), 2.55 (d, $^3J = 6.3 \text{ Hz}$, 2H, H-8), 3.10 – 3.20 (m, 1H, H-5_a), 3.26 – 3.38 (m, 1H, H-5_b), 4.04 – 4.21 (m, 1H, H-6), 5.20 (br s, 1H, H-4).



4.3.4.18 4-((tert-Butoxycarbonyl)amino)-3-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)butansäure (**178e**) [CK 256]¹⁴⁵

Imidazol (6.46 g, 94.89 mmol) wurde bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre zu einer Lösung aus TBS-Cl (4.81 g, 31.91 mmol) in absolutem DMF (15 mL) gegeben, und die Reaktionslösung wurde 15 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde eine Lösung aus der Hydroxysäure **178b** (2.00 g, 9.12 mmol) in wasserfreiem DMF (5 mL) bei 0 °C zugegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Et_2O (100 mL) verdünnt und mit Wasser (3 x 20 mL) und gesättigter wässriger NaCl-Lösung (2 x 20 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über MgSO_4 wurde das LM unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in einer Mischung aus MeOH (80 mL) und THF (80 mL) gelöst, und eine Lösung aus K_2CO_3 (3.20 g, 23.14 mmol) in Wasser (20 mL) wurde bei r.t. langsam zugegeben. Nach dem Rühren über Nacht bei r.t. wurden die organischen LM unter vermindertem Druck entfernt, und der wässrige Rückstand wurde mit verdünnter H_2SO_4 ($c = 1 \text{ M}$ in H_2O) auf pH= 3 angesäuert. Die wässrige Phase wurde mit Et_2O (3 x

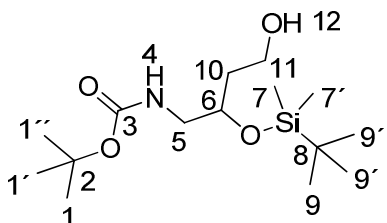
100 mL) extrahiert, und die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung (2 x 20 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über MgSO_4 wurde das LM unter vermindertem Druck abdestilliert. Aufreinigung des Rohprodukts mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , EtOAc/ *c*-Hexan, 3/7, v/v + 1 Vol% AcOH, R_f = 0.39) ergab die geschützte Säure **178e** (2.74 g, 90%) als farbloses Öl; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 0.07 (s, 3H, H-7*), 0.10 (s, 3H, H-7**), 0.88 (s, 9H, H-9, H-9', H-9''), 1.45 (s, 9H, H-1, H-1', H-1''), 2.51 (d, 3J = 6.3 Hz, 2H, H-10), 3.11 – 3.37 (m, 2H, H-5), 4.21 – 4.29 (m, 1H, H-6), 4.80 (br s, 1H, H-4); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = -4.8 (C-7*), -4.6 (C-7**), 18.1 (C-8), 25.9 (C-9, C-9', C-9''), 28.5 (C-1, C-1', C-1''), 40.1 (C-10), 46.0 (C-5), 68.4 (C-6), 79.9 (C-2), 156.4 (C-3), 175.3 (C-11); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 332.2 (100) $[\text{M}-\text{H}]^-$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_{15}\text{H}_{30}\text{NO}_5\text{Si}$ 332.1899 $[\text{M}-\text{H}]^-$; gemessen: 332.1889 $[\text{M}-\text{H}]^-$; IR: ν_{max} = 1101, 1166, 1251, 1367, 1713, 2359, 2930, 3348 cm^{-1} . * Zuordnung nicht gesichert.



4.3.4.19 4-((tert-Butoxycarbonyl)amino)-3-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)-butan-1-ol (**179a**) [CK 278]¹⁴⁶

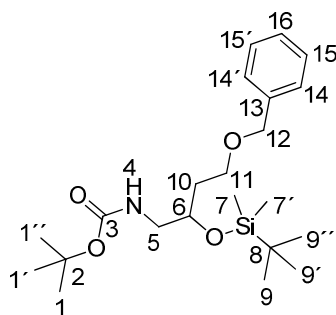
Zu einer Lösung aus der Säure **178e** (5.94 g, 17.81 mmol) in NEt_3 (2.51 mL, 17.81 mmol) und absolutem THF (80 mL) wurde bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre Ethylchloroformiat (1.68 mL, 17.69 mmol) langsam zugegeben, und die Reaktionslösung wurde für 20 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde eine Lösung aus NaBH_4 (2.02 g, 53.43 mmol) in wasserfreiem MeOH (30 mL) bei 0 °C zugetropft, und die Reaktionslösung wurde für 2 h bei r.t. gerührt. Nach dem Entfernen der LM unter vermindertem Druck wurde der Rückstand in EtOAc (100 mL) gelöst. Die organische Phase wurde mit Wasser (2 x 20 mL) und gesättigter wässriger NaCl-Lösung (2 x 20 mL) gewaschen und anschließend über MgSO_4 getrocknet. Nach dem Entfernen des LM unter vermindertem Druck wurde der Rückstand mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , EtOAc/ *c*-Hexan, 3/7, v/v, R_f = 0.39) aufgereinigt. Erhalten wurde der Alkohol **179a** (3.83 g, 67%) als farbloses Öl; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 0.09 (s, 6H, H-7, H-7'), 0.90 (s, 9H, H-9, H-9', H-9''), 1.44 (s, 9H, H-1, H-1', H-1''), 1.59 – 1.90 (m, 2H, H-10), 2.08 (br s, 1H, H-12), 3.09 – 3.34 (m, 2H, H-5), 3.74 (t, 3J = 6.1 Hz, 2H, H-11), 3.89 – 4.02 (m, 1H, H-6), 4.77 (br s, 1H, H-4); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = -4.6 (C-7*),

-4.5 (C-7^{*}), 18.2 (C-8), 26.0 (C-9, C-9', C-9''), 28.6 (C-1, C-1', C-1''), 36.8 (C-10), 46.1 (C-5), 59.7 (C-11), 70.1 (C-6), 79.5 (C-2), 154.1 (C-3); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 342.2 (100) [M+Na]⁺; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): C₁₅H₃₃NO₄SiNa 342.2071 [M+Na]⁺; gemessen: 342.2081 [M+Na]⁺; IR: ν_{\max} = 1005, 1021, 1169, 1251, 1507, 1695, 2359, 2953, 3368 cm⁻¹. * Zuordnung nicht gesichert.



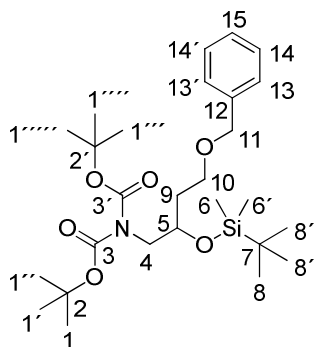
4.3.4.20 tert-Butyl-(4-(benzyloxy)-2-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)butyl)carbamate (179b) [CK 269]

Zu einer Lösung aus dem Alkohol **179a** (1.03 g, 3.21 mmol) in wasserfreiem THF (15 mL) wurde bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre NaH (0.15 g, 3.85 mmol, 60% in Mineralöl) portionsweise zugegeben, und die Reaktionslösung wurde für 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde Benzylbromid (1.15 mL, 9.67 mmol) bei 0 °C zugetropft, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Nach der Zugabe von gesättigter wässriger NH₄Cl-Lösung (5 mL) wurde die Reaktionslösung mit Et₂O (3 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (2 x 10 mL) und gesättigter wässriger NaCl-Lösung (2 x 5 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen über MgSO₄ wurde die LM unter vermindertem Druck entfernt. Aufreinigung des Rohprodukts mittels Säulenchromatographie (SiO₂, EtOAc/ c-Hexan, 1/9, v/v, R_f = 0.37) ergab den Benzylether **179b** (1.12 g, 84%) als gelbes Öl; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.05 (s, 3H, H-7^{*}), 0.07 (s, 3H, H-7^{*}), 0.89 (s, 9H, H-9, H-9', H-9''), 1.44 (s, 9H, H-1, H-1', H-1''), 1.76 (dt, ³J = 6.2 Hz, ³J = 6.2 Hz, 2H, H-10), 3.03 – 3.26 (m, 2H, H-5), 3.50 – 3.59 (m, 2H, H-11), 3.88 – 3.99 (m, 1H, H-6), 4.48 (d, ²J = 4.5 Hz, 2H, H-12), 4.77 (br s, 1H, H-4), 7.26 – 7.36 (m, 5H, H-14, H-14', H-15, H-15', H-16); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = -4.6 (C-7^{*}), -4.5 (C-7^{*}), 18.2 (C-8), 26.0 (C-9, C-9', C-9''), 28.6 (C-1, C-1', C-1''), 31.0 (C-10), 46.2 (C-5), 66.6 (C-11), 68.7 (C-6), 73.1 (C-12), 79.2 (C-2), 127.2 (C-16), 127.8 (C-14, C-14'), 128.5 (C-15, C-15'), 138.5 (C-13), 156.1 (C-3); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 432.2 (100) [M+Na]⁺; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): C₂₂H₃₉NO₄SiNa 432.2541 [M+Na]⁺; gemessen: 432.2540 [M+Na]⁺; IR: ν_{\max} = 697, 775, 834, 1095, 1170, 1250, 1506, 1704, 2359, 2954 cm⁻¹.



4.3.4.21 *Di-tert-(4-benzyloxy)-2-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)butyl)-dicarbamat (179i) [CK 320]*¹²⁵

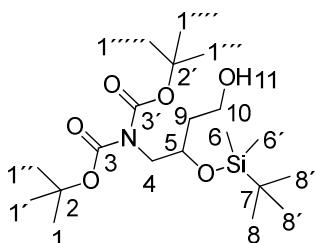
Zu einer Lösung des Benzylalkohols **179b** (0.83 g, 2.01 mmol) in wasserfreiem THF (10 mL) wurde bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre *n*-BuLi (0.97 mL, 2.42 mmol, *c*= 2.5 M in *n*-Hexan) zugetropft, und die Reaktionslösung wurde für 20 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde eine Lösung aus Boc₂O (0.53 g, 2.42 mmol) in wasserfreiem THF (4 mL) bei 0 °C zugetropft, und die Reaktionslösung wurde für 1 h bei r.t. gerührt. Nach der Zugabe von Et₂O (100 mL) wurde die Reaktionslösung mit Wasser (2 x 15 mL) und gesättigter wässriger NaCl-Lösung (2 x 15 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen über MgSO₄ wurden die LM unter vermindertem Druck abdestilliert. Aufreinigung des Rohprodukts mittels Säulenchromatographie (SiO₂, EtOAc/ *c*-Hexan, 1/9, v/v, R_f= 0.46) wurde das Dicarbamat **179i** (0.88 g, 86%) als farbloses Öl erhalten; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 0.03 (s, 3H, H-6*), 0.05 (s, 3H, H-6*), 0.87 (s, 9H, H-8, H-8', H-8''), 1.48 (s, 18H, H-1, H-1', H-1'', H-1''', H-1''', H-1'''), 1.67 – 1.75 (m, 1H, H-9_a), 1.78 – 1.88 (m, 1H, H-9_b), 3.47 – 3.59 (m, 3H, H-4_a, H-10), 3.73 (dd, ²J= 13.9 Hz, ³J= 7.5 Hz, 1H, H-4_b), 4.05 – 4.19 (m, 1H, H-5), 4.48 (s, 2H, H-11), 7.22 – 7.42 (m, 5H, H-13, H-13', H-14, H-14', H-15); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ= -4.8 (C-6*), -4.3 (C-6*), 18.1 (C-7), 26.0 (C-8, C-8', C-8''), 28.3 (C-1, C-1', C-1'', C-1''', C-1''', C-1'''), 35.5 (C-9), 51.6 (C-4), 66.7 (C-10), 67.9 (C-5), 73.0 (C-11), 82.3 (C-2, C-2'), 127.6 (C-15), 127.7 (C-13*, C-13*), 128.4 (C-14*, C-14*), 138.7 (C-12), 153.1 (C-3, C-3'); MS (ESI, 10 eV, *m/z* (%)): 532.3 (100) [M+Na]⁺; HR-MS (ESI, 10 eV, *m/z*): C₂₇H₄₇NO₆SiNa 532.3065 [M+Na]⁺; gemessen: 532.3063 [M+Na]⁺; IR: ν_{max}= 697, 734, 774, 835, 1116, 1366, 1697, 1738, 2341, 2359, 2856, 2929 cm⁻¹. * Zuordnung nicht gesichert.



4.3.4.22 Di-tert-(4-hydroxy)-2-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)butyl-dicarbamat (179j) [CK 323]⁹⁷

Eine Suspension aus dem Benzylether **179i** (0.88 g, 1.73 mmol) und Palladium (0.08 g, 10% aktiviert auf Kohlenstoff) in absolutem Ethanol (15 mL) wurde über Nacht unter H_2 -Atmosphäre (1 bar) bei r.t. gerührt. Die Suspension wurde durch Celite® 545 filtriert, und der Filterkuchen wurde mit EtOAc (20 mL) gewaschen. Nach dem Entfernen der LM der vereinigten organischen Phasen unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , EtOAc/ *c*-Hexan, 4/6, v/v, R_f = 0.58) aufgereinigt. Erhalten wurde der Alkohol **179j** (0.46 g, 63%) als farbloses Öl; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 0.09 (zwei s, 6H, H-6, H-6'), 0.89 (s, 9H, H-8, H-8', H-8''), 1.50 (s, 18H, H-1, H-1', H-1'', H-1''', H-1''', H-1'''), 1.58 – 1.87 (m, 3H, H-9, H-11), 3.58 (dd, 2J = 13.9 Hz, 3J = 6.3 Hz, 1H, H-4_a), 3.69 – 3.88 (m, 3H, H-4_b, H-10), 4.08 – 4.28 (m, 1H, H-5); ^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = -4.8 (C-6*), -4.3 (C-6*), 18.1 (C-7), 26.0 (C-8, C-8', C-8''), 28.3 (C-1, C-1', C-1'', C-1''', C-1''', C-1'''), 36.7 (C-9), 50.9 (C-4), 59.9 (C-10), 69.5 (C-5), 82.6 (C-2, C-2'), 153.2 (C-3, C-3'); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 442.3 (100) $[M+Na]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $C_{20}H_{41}NO_6SiNa$ 442.2595 $[M+Na]^+$; gemessen: 442.2596 $[M+Na]^+$; IR: ν_{max} = 774, 835, 1116, 1336, 1696, 1733, 2930, 3501 cm^{-1} .

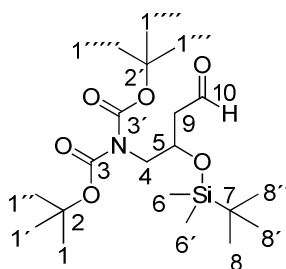
* Zuordnung nicht gesichert.



4.3.4.23 Di-tert-(4-oxo)-2-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)butyl-dicarbamat (181) [CK 325]¹²⁵

Eine Lösung aus DMSO (0.31 mL, 4.36 mmol) in absolutem CH_2Cl_2 (2 mL) wurde bei -78 °C unter Ar-Atmosphäre zu einer Lösung aus Oxalylchlorid (0.19 mL, 2.18 mmol) in

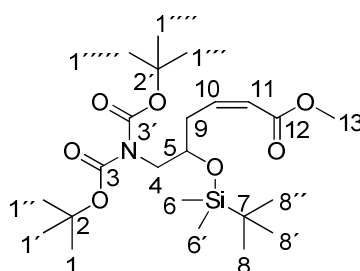
absolutem CH_2Cl_2 (9 mL) langsam zugetropft, und die Reaktionslösung wurde 5 min bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. Anschließend wurde bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ eine Lösung aus dem Alkohol **179j** (0.46 g, 1.09 mmol) in absolutem CH_2Cl_2 (2 mL) langsam zugetropft, und die Reaktionslösung wurde für weitere 40 min bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. Nach der tropfenweise Zugabe von NEt_3 (0.91 mL, 6.54 mmol) bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ wurde die Reaktionslösung für 1 h bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. Wasser (10 mL) und anschließend Et_2O (100 mL) wurden zur Reaktionslösung zugegeben, und die organische Phase wurde separiert. Die organische Phase wurde mit Wasser (2 x 20 mL) und gesättigter wässriger NaCl-Lösung (2 x 10 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Na_2SO_4 wurde die LM unter vermindertem Druck entfernt. Aufreinigung des Rohprodukts mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , $\text{EtOAc}/c\text{-Hexan}$, 1/4, v/v, $R_f = 0.63$) ergab den Aldehyd **181** (0.41 g, 83%) als farbloses Öl; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.06$ (s, 3H, H-6*), 0.09 (s, 3H, H-6*), 0.86 (s, 9H, H-8, H-8', H-8''), 1.50 (s, 18H, H-1, H-1', H-1'', H-1''', H-1''', H-1'''), 2.48 – 2.58 (m, 2H, H-9), 3.63 (dd, $^2J = 13.9\text{ Hz}$, $^3J = 7.0\text{ Hz}$, 1H, H-4_a), 3.75 (dd, $^2J = 13.9\text{ Hz}$, $^3J = 6.6\text{ Hz}$, 1H, H-4_b), 4.31 – 4.56 (m, 1H, H-5), 9.81 (t, $^4J = 2.3\text{ Hz}$, 1H, H-10); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = -4.8$ (C-6*), -4.3 (C-6*), 18.1 (C-7), 25.9 (C-8, C-8', C-8''), 28.2 (C-1, C-1', C-1'', C-1''', C-1''', C-1'''), 49.0 (C-9), 51.0 (C-4), 66.5 (C-5), 82.9 (C-2, C-2'), 153.0 (C-3, C-3'), 201.5 (C-10); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 440.2 (17) $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_{20}\text{H}_{39}\text{NO}_6\text{SiNa}$ 440.2439 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gemessen: 440.2436 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR: $\nu_{\text{max}} = 1124, 1352, 1367, 1697, 1736, 2360, 2980\text{ cm}^{-1}$. * Zuordnung nicht gesichert.



4.3.4.24 *cis*-6-((Di-tert-butoxycarbonyl)amino)-5-((tert-butyl dimethylsilyl)oxy)-hex-2-ensäuremethylester (**182a**) [CK 326]

Analog zu AAV 5 wurde bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ unter Ar-Atmosphäre zu einer Lösung aus O,O'-Bis-(2,2,2-trifluorethyl)-phosphono-essigsäuremethylester (**149b**) (0.26 mL, 1.23 mmol) und [18]Krone-6 (**150**) (1.11 g, 7.05 mmol) in wasserfreiem THF (6 mL) KHMDS (2.42 mL, 1.21 mmol, $c = 0.5\text{ M}$ in Toluol) langsam zugetropft, und die Reaktionslösung wurde für 30 min bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. Anschließend wurde bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ eine Lösung aus dem Aldehyd **181** (0.34 g, 0.81 mmol) in wasserfreiem THF (2 mL) langsam zugetropft, und die Reaktionslösung wurde über Nacht unter Rühren auf r.t. erwärmt. Nach der Zugabe

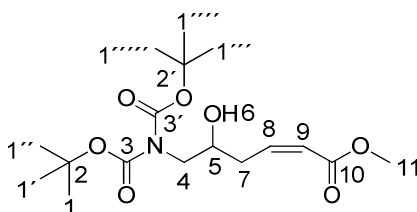
von gesättigter wässriger NH_4Cl -Lösung (10 mL) wurde die Reaktionslösung mit EtOAc (2 x 40 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (2 x 15 mL) und gesättigter wässriger NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Na_2SO_4 wurde die LM unter vermindertem Druck abdestilliert. Aufreinigung mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , EtOAc/ *c*-Hexan, 1/1, v/v, R_f = 0.54) ergab den Ester **182a** (0.41 g, 84%, *E/Z*= 1/9) als farbloses Öl; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 0.05 (s, 6H, H-6, H-6'), 0.87 (s, 9H, H-8, H-8', H-8''), 1.50 (s, 18H, -1, H-1', H-1'', H-1''', H-1''', H-1'''''), 2.70 – 2.97 (m, 2H, H-9), 3.47 (dd, 2J = 14.0 Hz, 3J = 5.1 Hz, 1H, H-4_a), 3.70 (s, 3H, H-13), 3.75 (dd, 2J = 14.0 Hz, 3J = 5.7 Hz, 1H, H-4_b), 4.10 – 4.20 (m, 1H, H-5), 5.87 (dt, 3J = 11.6 Hz, 4J = 1.8 Hz, 1H, H-11), 6.40 (dt, 3J = 11.6 Hz, 3J = 7.2 Hz, 1H, H-10); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = -4.7 (C-6*), -4.4 (C-6*), 18.1 (C-7), 26.0 (C-8, C-8', C-8''), 28.3 (C-1, C-1', C-1'', C-1''', C-1''', C-1'''''), 34.8 (C-9), 51.1 (C-4), 51.2 (C-13), 69.4 (C-5), 82.4 (C-2, C-2'), 121.1 (C-11), 145.8 (C-10), 153.0 (C-3, C-3'); 166.8 (C-12); MS (ESI, 10 eV, *m/z* (%)): 496.3 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, *m/z*): $\text{C}_{23}\text{H}_{43}\text{NO}_7\text{SiNa}$ 496.2701 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gemessen: 496.2704 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR: ν_{max} = 775, 835, 1113, 1144, 1172, 1255, 1352, 1366, 1696, 1724, 2361 cm^{-1} . * Zuordnung nicht gesichert.



4.3.4.25 *cis*-6-((Di-*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-hydroxy-hex-2-ensäuremethyl-ester (**182b**) [CK 328]¹¹⁰

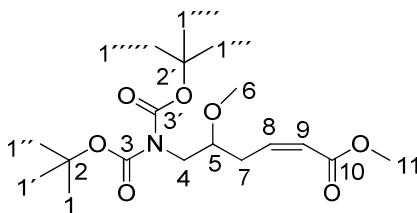
Zu einer Lösung aus dem geschützten Alkohol **182a** (0.28 g, 0.60 mmol) in wasserfreiem THF (10.0 mL) und Pyridin (6.5 mL) wurde bei r.t. HF (1.85 mL, 70%ig in Pyridin) gegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Nach der Zugabe von EtOAc (50 mL) wurde die organische Phase mit gesättigter wässriger NH_4Cl -Lösung (2 x 10 mL), H_2O (2 x 10 mL) und gesättigter wässriger NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Na_2SO_4 wurde die organischen LM unter vermindertem Druck abdestilliert. Aufreinigung des Rohproduktes mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , EtOAc/ *c*-Hexan, 1/4, v/v, R_f = 0.20) ergab den Alkohol **182b** (0.11 g, 52%) als farbloses Öl; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.49 (s, 18H, H-1, H-1', H-1'', H-1''', H-1''', H-1'''''), 2.52 – 2.94 (m, 2H, H-7), 3.30 (br s, 1H, H-6), 3.62 (dd, 2J = 14.6 Hz, 3J = 8.3 Hz, 1H, H-4_a), 3.68 – 3.72 (m, 4H, H-4_b, H-11),

3.85 – 3.95 (m, 1H, H-5), 5.89 (dt, $^3J = 11.5$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, 1H, H-9), 6.38 (dt, $^3J = 11.5$ Hz, $^3J = 7.4$ Hz, 1H, H-8); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 28.1$ (C-1, C-1', C-1''), 34.7 (C-7), 51.2 (C-11), 52.0 (C-4), 70.7 (C-5), 83.2 (C-2, C-2'), 121.5 (C-9), 145.7 (C-8), 153.7 (C-3, C-3'), 167.0 (C-10); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 382.2 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_{17}\text{H}_{29}\text{NO}_7\text{SiNa}$ 382.1836 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gemessen: 382.1833 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR: $\nu_{\text{max}} = 853, 1112, 1366, 1693, 1721, 2979, 3478 \text{ cm}^{-1}$.



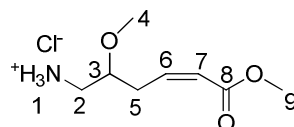
4.3.4.26 *cis*-6-((Di-*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-methoxy-hex-2-ensäuremethylester (**182c**) [CK 331]¹⁴⁹

Zu einer Lösung aus dem Alkohol **182b** (0.73 g, 2.04 mmol) und 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylpyridin (0.84 g, 4.08 mmol) in wasserfreiem CH_2Cl_2 (25 mL) wurde bei r.t. unter Ar-Atmosphäre Trifluormethansulfonsäuremethylester (0.48 mL, 4.21 mmol) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde für 2 d bei r.t. gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Et_2O (25 mL) verdünnt, und der entstandene, weiße Feststoff wurde abfiltriert. Die LM des Filtrats wurden unter vermindertem Druck entfernt, und das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , $\text{EtOAc}/c\text{-Hexan}$, 1/0 \rightarrow 1/4, $R_f = 0.50$) aufgereinigt. Erhalten wurde der Methylether **182c** (0.65 g, 85%) als farbloses Öl; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.50$ (s, 18H, H-1, H-1', H-1'', H-1''', H-1''', H-1'''), 2.71 – 2.97 (m, 2H, H-7), 3.36 (s, 3H, H-6), 3.53 – 3.61 (m, 2H, H-4), 3.70 (s, 3H, H-11), 3.73 – 3.83 (m, 1H, H-5), 5.87 (dt, $^3J = 11.6$ Hz, $^4J = 1.8$ Hz, 1H, H-9), 6.34 (dt, $^3J = 11.6$ Hz, $^3J = 7.2$ Hz, 1H, H-8); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 28.2$ (C-1, C-1', C-1'', C-1''', C-1''', C-1'''), 31.4 (C-7), 49.0 (C-4), 51.2 (C-11), 57.7 (C-6), 69.2 (C-5), 82.4 (C-2, C-2'), 121.2 (C-9), 145.6 (C-8), 153.0 (C-3, C-3'), 166.7 (C-10); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 396.2 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_{18}\text{H}_{31}\text{NO}_7\text{Na}$ 396.1993 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gemessen: 396.1991 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR: $\nu_{\text{max}} = 854, 1109, 1169, 1366, 1697, 1721, 2979 \text{ cm}^{-1}$.



4.3.4.27 *cis*-6-Amino-5-methoxyhex-2-ensäuremethylester Hydrochlorid (**182d**) [CK 336]¹⁰⁰

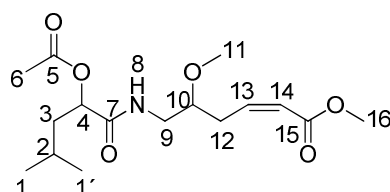
Eine Lösung aus dem geschützten Amin **182c** (0.47 g, 1.26 mmol) in verdünnter Salzsäure (2.50 mL, $c = 4$ M in 1,4-Dioxan) wurde für 2 h bei r.t. gerührt. Entfernen des LM unter vermindertem Druck und Trocknung des Rückstands über Nacht unter Hochvakuum ergab das Hydrochlorid **182d** (0.26 g, quant.) als weißen Feststoff; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.85 - 3.03$ (m, 2H, H-2_a^* , H-5_a^*), $3.03 - 3.19$ (m, 2H, H-2_b^* , H-5_b^*), 3.47 (s, 3H, H-4), 3.71 (s, 3H, H-9), $3.75 - 3.84$ (m, 1H, H-3), 5.93 (dt, $^3J = 11.5$ Hz, $^4J = 1.4$ Hz, 1H, H-7), 6.26 (dt, $^3J = 11.5$ Hz, $^3J = 7.8$ Hz, 1H, H-6); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 30.0$ (C-5), 42.5 (C-2), 51.5 (C-9), 57.4 (C-4), 67.2 (C-3), 122.7 (C-7), 143.2 (C-6), 166.7 (C-8); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 174.1 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{NO}_3$ 174.1125 $[\text{M}+\text{H}]^+$; gemessen: 174.1127 $[\text{M}+\text{H}]^+$; IR: $\nu_{\text{max}} = 1099, 1177, 1203, 1235, 1714, 2359, 2897$ cm^{-1} .



4.3.4.28 *cis*-6-(2-Acetoxy-4-methylpentanamido)-5-methoxyhex-2-ensäuremethylester (**183a**) [CK 337]

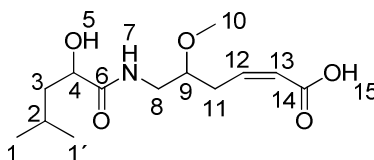
Zu einer Lösung aus der Säure **80b** (0.23 g, 1.32 mmol) in wasserfreiem CH_2Cl_2 (20 mL) wurde bei 0°C unter Ar -Atmosphäre EDC-HCl (0.30 g, 1.58 mmol) und HOBt (0.21 g, 1.58 mmol) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde für 30 min bei 0°C gerührt. Anschließend wurden *N*-Methylmorpholin (NMM) (0.14 mL, 1.32 mmol) und eine Lösung aus dem Hydrochlorid **182d** (0.27 g, 1.32 mmol) in wasserfreiem CH_2Cl_2 (2 mL) bei 0°C zugegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Nach der Zugabe von EtOAc (50 mL) wurde die Reaktionslösung mit gesättigter wässriger NH_4Cl -Lösung (2 x 10 mL), gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lösung (2 x 10 mL), Wasser (2 x 10 mL) und gesättigter wässriger NaCl -Lösung (2 x 10 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über MgSO_4 wurde das LM unter vermindertem Druck abdestilliert. Aufreinigung des Rohprodukts mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , EtOAc/ c-Hexan , 1/3, $R_f = 0.23$) ergab das Amid **183a** (0.25 g, 59%) als farbloses Öl in zwei Diastereomeren; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.83$ und 0.84 (d, $^3J = 5.6$ Hz, 6H, H-1, H-1'), $1.52 - 1.69$ (m, 3H, H-2, H-3), 2.07 und 2.08 (s, 3H, H-6), $2.57 - 2.68$ (m, 1H, H-12_a), $2.78 - 2.98$ (m, 1H, H-12_b), $3.15 - 3.28$ (m, 2H, H-9), $3.29 - 3.39$ (m, 4H, H-10, H-11), 3.61 (s, 3H, H-16), $5.04 - 5.11$ (m, 1H, H-4), 5.83 (dd, $^3J = 11.6$ Hz, $^4J = 0.7$ Hz, 1H, H-14), 6.20 (dt, $^3J = 11.6$ Hz, $^3J = 8.0$ Hz, 1H, H-13), 6.73 (br d, $^3J = 4.7$ Hz, 1H, H-8); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 20.78$ und 20.81 (C-6), 21.7 (C-1), 23.00 und 23.01

(C-1^{*}), 24.5 (C-2), 30.3 und 30.4 (C-12), 40.3 und 40.4 (C-3), 40.8 (C-9), 51.1 (C-16), 56.91 und 56.93 (C-11), 72.7 (C-4), 78.1 und 78.4 (C-10), 121.7 (C-14), 144.87 und 144.94 (C-13), 166.85 und 166.89 (C-15^{*}), 169.8 und 169.9 (C-5^{*}), 170.5 und 170.6 (C-7^{*}); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 352.2 (100) [M+Na]⁺; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): C₁₆H₂₇NO₆Na 352.1731 [M+Na]⁺; gemessen: 352.1730 [M+Na]⁺; IR: ν_{\max} = 1022, 1060, 1116, 1171, 1218, 1662, 1721, 1742, 2955, 3306 cm⁻¹. * Zuordnung nicht gesichert.



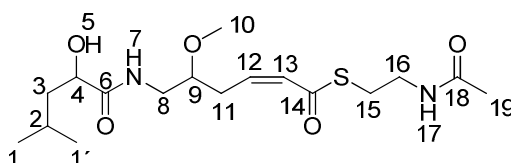
4.3.4.29 *cis*-6-(2-Hydroxy-4-methylpentanamido)-5-methoxyhex-2-ensäure (**183b**) [CK 350]¹⁵⁰

Zu einer Lösung aus dem Methylester **183a** (0.23 g, 0.70 mmol) in THF (10 mL) und Wasser (9 mL) wurde NaOH (1.06 mL, $c = 1$ M in H₂O) bei r.t. zugegeben. Nach dem Rühren der Reaktionslösung für 2 h bei r.t. wurde weiteres NaOH (0.53 mL, $c = 1$ M in H₂O) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde für 5 h bei r.t. gerührt. Nach dem Ansäuern der Reaktionslösung mit NaHSO₄-Lösung ($c = 1$ M in H₂O) auf pH = 2, wurde die Reaktionslösung mit EtOAc (3 x 25 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung (2 x 10 mL) gewaschen und anschließend über MgSO₄ getrocknet. Nach dem Entfernen der LM unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (SiO₂, EtOAc + 1 Vol% AcOH, $R_f = 0.48$) aufgereinigt. Erhalten wurde die Säure **183b** (0.13 g, 70%) als farbloses Öl in zwei Diastereomeren; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.91 – 0.96 (m, 6H, H-1, H-1'), 1.40 – 1.65 (m, 2H, H-3), 1.74 – 1.92 (m, 1H, H-2), 2.79 – 2.97 (m, 2H, H-11), 3.21 – 3.58 (m, 6H, H-8, H-9, H-10), 4.21 (td, ³ $J = 9.1$ Hz, ³ $J = 3.8$ Hz, 1H, H-4), 5.88 – 5.99 (m, 1H, H-13), 6.26 – 6.42 (m, 1H, H-12), 7.28 – 7.39 (br m, 1H, H-7); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 21.47 und 21.51 (C-1^{*}), 23.55 (C-1^{*}), 24.7 (C-2), 30.98 und 31.00 (C-11), 40.4 und 40.6 (C-3), 43.65 und 43.74 (C-8), 57.2 (C-10), 70.9 und 71.0 (C-4), 78.8 und 78.9 (C-9), 122.0 und 122.3 (C-13), 146.0 und 146.4 (C-12), 169.9 und 170.0 (C-6^{*}), 176.2 und 176.4 (C-14^{*}); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 272.2 (100) [M-H]⁻; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): C₁₃H₂₂NO₅ 272.1503 [M-H]⁻; gemessen: 272.1509 [M-H]⁻; IR: ν_{\max} = 1101, 1140, 1195, 1432, 1636, 1698, 2361, 2870, 2955, 3353 cm⁻¹. * Zuordnung nicht gesichert.



4.3.4.30 *cis*-S-(2-Acetamidoethyl)-6-(2-hydroxy-4-methylpentanamido)-5-methoxyhex-2-enthioat (**79**) [CK 352]

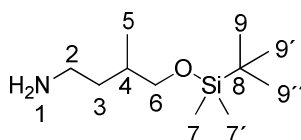
EDC-HCl (0.26 g, 1.36 mmol) wurde unter Ar-Atmosphäre bei 0 °C zu einer Lösung aus der Säure **183b** (0.31 g, 1.13 mmol), *N*-Acetylcysteamin (**120**) (0.24 mL, 2.27 mmol), HOBt (0.21 g, 1.36 mmol) und katalytischen Mengen an 4-DMAP in wasserfreiem CH₂Cl₂ (10 mL) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit EtOAc (50 mL) verdünnt und mit gesättigter wässriger NH₄Cl-Lösung (10 mL), gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung (10 mL), Wasser (10 mL) und gesättigter wässriger NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über MgSO₄ wurden die LM unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde zunächst mittels Säulenchromatographie (Florisil®, EtOAc, R_f = 0.13) vorgereinigt. Weitere Aufreinigung mittels HPLC (Knauer Eurospher 100 RP C-18, MeOH/ H₂O + 1 Vol% TFA, 55/45, 15 mL/min) ergab den Thioester **79** (0.06 g, 13%) als wachsartigen, weißen Feststoff in zwei Diastereomeren; t_R = 9.46 min; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.94 (d, ³J = 6.2 Hz, 6H, H-1, H-1'), 1.43 – 1.70 (m, 2H, H-3), 1.77 – 1.92 (m, 1H, H-2), 1.98 (s, 3H, H-19), 2.75 – 2.96 (m, 2H, H-11), 2.97 – 3.18 (m, 2H, H-15), 3.30 – 3.51 (m, 8H, H-8, H-9, H-10, H-16), 4.11 – 4.26 (m, 1H, H-4), 6.05 – 6.16 (m, 1H, H-12), 6.19 (dd, ³J = 11.3 Hz, ⁴J = 2.6 Hz, 1H, H-13), 6.45 und 6.50 (br s, 1H, H-17), 7.21 (br s, 1H, H7); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 21.4 (C-1*), 23.1 (C-19*), 23.6 (C-1*), 24.7 (C-2), 28.6 (C-15), 31.76 und 31.81 (C-11), 39.56 und 39.63 (C-16), 41.0 (C-3), 43.8 und 43.9 (C-8), 57.2 (C-10), 70.7 (C-4), 78.7 und 78.9 (C-9), 128.15 und 128.19 (C-13), 142.07 und 142.13 (C-12), 171.4 (C-18*), 175.7 (C-6*), 190.4 (C-14); MS (ESI, 10 eV, *m/z* (%)): 397.2 (100) [M+Na]⁺, 375.2 (40) [M+H]⁺; HR-MS (ESI, 10 eV, *m/z*): C₁₇H₃₁N₂O₅S 375.1948 [M+H]⁺; gemessen: 375.1948 [M+H]⁺; IR: ν_{max} = 1042, 1098, 1286, 1370, 1434, 1530, 1651, 2932, 3292 cm⁻¹. * Zuordnung nicht gesichert.



4.3.4.31 4-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-3-methylbutan-1-amin (**160b**) [CK 209]¹²¹

Zu einer Lösung aus dem Amin **160a** (5.00 g, 48.47 mmol) in wasserfreiem Pyridin (50 mL) wurde unter Ar-Atmosphäre TBS-Cl (12.38 g, 82.14 mmol) zugegeben,

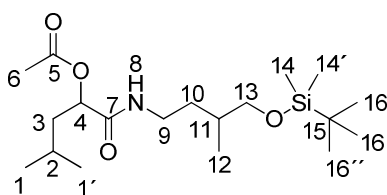
und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Nach dem Entfernen des LM unter vermindertem Druck wurde der Rückstand in CHCl_3 (40 mL) aufgenommen und mit gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lösung (3 x 20 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Na_2SO_4 wurde das LM unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NEt}_3$, 87.5/10.0/2.5, v/v/v, $R_f=0.58$) aufgereinigt. Erhalten wurde der geschützte Alkohol **160b** (10.07 g, 96%) als farbloses Öl; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta=$ 0.03 (s, 6H, H-7, H-7'), 0.84 – 0.92 (m, 12H, H-5, H-9, H-9', H-9''), 1.20 – 1.36 (m, 1H, H-4), 1.45 – 1.61 (m, 2H, H-3), 2.16 (br s, 2H, H-1), 2.60 – 2.85 (m, 2H, H-2), 3.62 (dd, $^3J=6.0$ Hz, $^3J=3.2$ Hz, 2H, H-6); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta=$ -5.2 (C-7, C-7'), 16.9 (C-5), 18.5 (C-8), 26.10 (C-9, C-9', C-9''), 33.7 (C-4), 37.2 (C-3), 40.1 (C-2), 68.5 (C-6); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 218.2 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_{11}\text{H}_{27}\text{NOSiNa}$ 240.1754 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gemessen: 240.1751 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR: $\nu_{\text{max}}=775, 835, 1092, 1521, 1471, 1668, 2358, 2927, 3311\text{ cm}^{-1}$.



4.3.4.32 1-((4-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)-3-methylbutyl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl-acetat (**161a**) [CK 210]

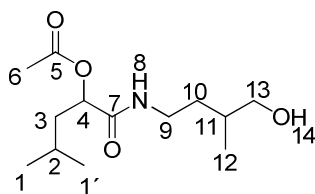
Analog AAV 1 wurden bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre zu einer Lösung aus der Säure **80b** (3.00 g, 17.22 mmol) in wasserfreiem CH_2Cl_2 (90 mL) EDC-HCl (3.96 g, 20.66 mmol) und HOBt (2.79 g, 20.66 mmol) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde für 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde eine Lösung aus dem Amin **160b** (4.49 g, 20.66 mmol) in wasserfreiem CH_2Cl_2 (10 mL) und katalytische Mengen an 4-DMAP zugegeben, und die Reaktion wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit EtOAc (100 mL) verdünnt, und die organische Phase wurde mit gesättigter wässriger NH_4Cl -Lösung (2 x 15 mL), gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lösung (2 x 15 mL) und gesättigter wässriger NaCl -Lösung (2 x 15 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Na_2SO_4 wurde das LM unter vermindertem Druck abdestilliert. Reinigung mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , $c\text{-Hexan}/\text{EtOAc}$, 7/3, v/v, $R_f=0.58$) ergab das Amid **161a** (5.19 g, 81%) als farbloses Öl in zwei Diastereomeren; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta=$ 0.04 (s, 6H, H-14, H-14'), 0.87 – 0.95 (m, 18H, H-1, H-1', H-12, H-16, H-16', H-16''), 1.30 – 1.40 (m, 1H, H-11), 1.53 – 1.75 (m, 5H, H-2, H-3, H-10), 2.13 (s, 3H, H-6), 3.26 -3.37 (m, 2H, H-9), 3.40 (ddd, $^2J=10.0$ Hz, $^3J=6.3$ Hz, $^4J=1.7$ Hz, 1H, H-13_a), 3.46 (ddd, $^2J=10.0$ Hz, $^3J=5.4$ Hz,

$^4J = 3.3$ Hz, 1H, H-13_b), 5.13 – 5.19 (m, 1H, H-4), 6.05 (br s, 1H, H-8); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = -5.26$ und -5.25 (C-14^{*}), -5.23 und -5.20 (C-14^{*}), 16.85 und 16.87 (C-12), 18.46 und 18.47 (C-15), 21.1 (C-6), 22.0 (C-1^{*}), 23.2 (C-1^{*}), 24.7 (C-2), 26.1 (C-16, C-16', C-16''), 33.5 (C-10), 33.7 und 33.9 (C-11), 37.4 und 37.5 (C-3), 41.0 (C-9), 68.2 und 68.3 (C-13), 73.12 und 73.13 (C-4), 169.9 (C-5^{*}), 170.2 (C-7^{*}); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 396.3 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 374.3 (8) $[\text{M}+\text{H}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_{19}\text{H}_{39}\text{NO}_4\text{SiNa}$ 396.2541 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gemessen: 396.2539 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR: $\nu_{\text{max}} = 836, 1092, 1218, 1228, 1370, 1353, 1745, 2359, 2930, 2956, 3292$ cm^{-1} . * Zuordnung ist nicht gesichert.



4.3.4.33 1-((4-Hydroxy-3-methylbutyl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl-acetat (161b) [CK 214]¹¹⁰

Eine Lösung aus dem TBS-Alkohol **161a** (2.00 g, 5.35 mmol) in THF (60 mL), Pyridin (21 mL) und HF (6 mL, 70% HF in Pyridin) wurde für 6 h bei r.t. gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit EtOAc (100 mL) verdünnt und mit gesättigter wässriger NH_4Cl -Lösung (2 x 30 mL), HCl-Lösung (3 x 30 mL, $c = 1.2$ M in H_2O), gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lösung (3 x 30 mL) und gesättigter wässriger NaCl-Lösung (2 x 30 mL) extrahiert. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Na_2SO_4 wurde das LM unter vermindertem Druck abdestilliert. Erhalten wurde der Alkohol **161b** (1.15 g, 83%) als farbloses Öl in zwei Diastereomeren und diese wurde ohne weitere Aufreinigung verwendet; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.89 - 0.94$ (m, 9H, H-1, H-1', H-12), 1.37 – 1.50 (m, 1H, H-11), 1.56 – 1.75 (m, 5H, H-2, H-3, H-10), 2.13 (s, 3H, H-6), 2.23 (bs, 1H, H-14), 3.20 – 3.31 (m, 1H, H-9_a), 3.31 – 3.47 (m, 2H, H-9_b, H-13_a), 3.53 (ddd, $^2J = 10.6$ Hz, $^3J = 5.0$ Hz, $^4J = 3.7$ Hz, 1H, H-13_b), 5.08 – 5.19 (m, 1H, H-4), 6.39 (br s, 1H, H-8); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 17.01$ und 17.02 (C-12), 21.1 (C-6), 21.9 (C-1^{*}), 23.2 (C-1^{*}), 24.7 (C-2), 33.5 (C-10), 33.7 und 33.8 (C-11), 37.4 und 37.5 (C-3), 40.9 (C-9), 67.8 (C-13), 73.0 (C-4), 170.17 und 170.19 (C-7^{*}), 170.52 und 170.54 (C-5^{*}); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 282.2 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 260.2 (7) $[\text{M}+\text{H}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{NO}_4$ 260.1856 $[\text{M}+\text{H}]^+$; gemessen: 260.1847 $[\text{M}+\text{H}]^+$; IR: $\nu_{\text{max}} = 1043, 1226, 1371, 1541, 1653, 1744, 2361, 2872, 2957, 3306$ cm^{-1} . * Zuordnung nicht gesichert.



4.3.4.34 *cis*-6-(2-Acetoxy-4-methylpentanamido)-4-methylhex-2-ensäureethylester (**163a**) [CK 219 + CK 220]⁸⁰

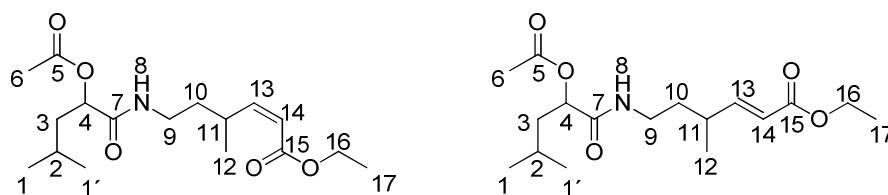
Eine Suspension aus dem Alkohol **161b** (1.15 g, 4.44 mmol), PCC (2.47 g, 11.46 mmol) und Natriumacetat (1.42 g, 17.31 mmol) in wasserfreiem CH₂Cl₂ (5 mL) wurde für 2 h unter Ar-Atmosphäre bei r.t. gerührt. Nach der Zugabe von Et₂O (30 mL) und *n*-Pentan (30 mL) wurde die Suspension durch SiO₂ filtriert, und die LM wurden unter vermindertem Druck abdestilliert. Der Aldehyd **162** (0.87 g, 76%) wurde ohne weitere Aufreinigung direkt in der nächsten Stufe weiter verwendet.

Analog zu AAV 5 wurde bei -78 °C unter Ar-Atmosphäre zu einer Lösung aus O,O'-Bis-(2,2,2-trifluorethyl)-phosphono-essigsäureethylester (**149a**) (1.07 mL, 5.03 mmol) und [18]Krone-6 (**150**) (4.61 g, 17.44 mmol) in wasserfreiem THF (15 mL) KHMDS (9.99, 5.00 mmol, *c* = 0.5 M in Toluol) langsam zugetropft, und die Reaktionslösung wurde für 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde bei -78 °C eine Lösung aus dem Aldehyd **162** (0.87 g, 3.37 mmol) in wasserfreiem THF (2 mL) langsam zugetropft, und die Reaktionslösung wurde über Nacht unter Rühren auf r.t. erwärmt. Nach der Zugabe von gesättigter wässriger NH₄Cl-Lösung (20 mL) wurde die Reaktionslösung mit EtOAc (2 x 60 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (2 x 15 mL) und gesättigter wässriger NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Na₂SO₄ wurde das LM unter vermindertem Druck abdestilliert. Aufreinigung mittels Säulenchromatographie (SiO₂, EtOAc/ *c*-Hexan, 2/3, *v/v*) ergab den Ester als eine Mischung aus dem *Z*-Isomer **163a** (0.05 g, 5%, *R*_f = 0.51) und dem *E*-Isomer **163b** (0.37 g, 34%, *R*_f = 0.49) als farblose Öle in je zwei Diastereomeren.

cis-Isomer **163a**: ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.92 (d, ³*J* = 6.4 Hz, 6H, H-1, H-1'), 0.99 und 1.01 (d, ³*J* = 6.5 Hz, 3H, H-12), 1.19 – 1.37 (m, 4H, H-10_a, H-17), 1.57 – 1.78 (m, 4H, H-2, H-3, H-10_b), 2.18 und 2.19 (s, 3H, H-6), 2.65 – 2.76 (m, 1H, H-11), 3.37 – 3.56 (m, 1H, H-9_a), 3.60 – 3.72 (m, 1H, H-9_b), 4.08 – 4.17 (m, 2H, H-16), 5.09 – 5.28 (m, 1H, H-4), 5.81 (d, ³*J* = 11.6 Hz, 1H, H-14), 5.88 (dd, ³*J* = 11.6 Hz, ³*J* = 10.3 Hz, 1H, H-13), 7.14 – 7.25 (br m, 1H, H-8); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 14.3 (C-17), 21.0 (C-1'), 21.1 und 21.2 (C-12'), 21.8 und 21.9 (C-6), 23.3 (C-1'), 24.68 und 24.73 (C-2), 30.0 und 30.1 (C-11), 36.1 und 36.3 (C-10), 36.4 und 36.6 (C-3), 40.99 und 41.02 (C-9), 60.34 (C-16),

72.8 und 72.9 (C-4), 119.5 und 119.6 (C-14), 154.7 und 155.0 (C-13), 167.3 (C-15), 170.1 und 170.3 (C-5^{*}), 170.4 und 170.6 (C-5^{*}); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 350.2 (100) [M+Na]⁺, 328.2 (7) [M+H]⁺; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): C₁₇H₃₀NO₅ 328.2118 [M+H]⁺; gemessen: 328.2118 [M+Na]⁺; IR: ν_{\max} = 1028, 1184, 1260, 1468, 1539, 1633, 1660, 2364, 2922, 3362 cm⁻¹. * Zuordnung nicht gesichert.

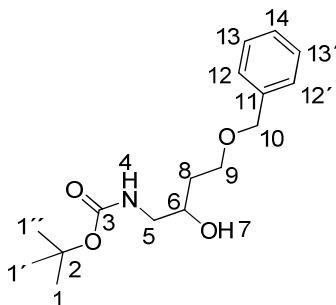
trans-Isomer **163b**: ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.91 (d, ³J = 6.2 Hz, 3H, H-1^{*}), 0.92 (d, ³J = 6.2 Hz, 3H, H-1^{*}), 1.06 (d, ³J = 6.7 Hz, 3H, H-12), 1.26 und 1.27 (t, ³J = 7.2 Hz, 3H, H-17), 1.50 – 1.73 (m, 5H, H-2, H-3, H-10), 2.12 (s, 3H, H-6), 2.23 – 2.44 (m, 1H, H-11), 3.18 – 3.30 (m, 2H, H-9), 4.10 – 4.25 (m, 2H, H-16), 5.04 – 5.19 (m, 1H, H-4), 5.78 und 5.79 (dd, ³J = 15.7 Hz, ⁴J = 1.1 Hz, 1H, H-14), 6.03 (br s, 1H, H-8), 6.81 und 6.82 (dd, ³J = 15.7 Hz, ³J = 8.0 Hz, 1H, H-13); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 14.0 und 14.3 (C-17), 19.45 und 19.50 (C-12), 21.1 (C-1^{*}), 21.9 (C-6), 23.2 (C-1^{*}), 24.6 (C-2), 34.49 und 34.53 (C-11^{*}), 35.7 (C-10^{*}), 37.42 und 37.44 (C-3), 40.9 (C-9), 60.42 (C-16), 73.0 (C-4), 120.57 und 120.58 (C-14), 153.05 und 153.09 (C-13), 166.71 und 166.72 (C-15), 170.0 (C-15^{*}), 170.3 (C-5^{*}). * Zuordnung nicht gesichert.



4.3.4.35 *tert*-Butyl (4-(benzyloxy)-2-hydroxybutyl)carbamate (**179d**) [CK 272]¹⁴⁷

Zu einer Lösung aus dem Silylether **179b** (0.35 g, 0.86 mmol) in absolutem CH₂Cl₂ (8 mL) wurde bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre TFA (2.15 mL) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde für 3 h bei 0 °C gerührt. Das LM wurde unter vermindertem Druck abdestilliert, und der Rückstand wurde in gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung (25 mL) gelöst. Die wässrige Phase wurde mit CH₂Cl₂ (3 x 25 mL) extrahiert, und die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet. Nach dem Abdestillieren des LM unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (SiO₂, EtOAc/ *c*-Hexan, 1/1, v/v, R_f = 0.5) aufgereinigt. Erhalten wurde der Alkohol **179d** (0.19 g, 72%) als farbloses Öl; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.44 (s, 9H, H-1, H-1', H-1''), 1.66 – 1.82 (m, 2H, H-8), 3.00 – 3.12 (m, 1H, H-5_a), 3.22 – 3.27 (m, 1H, H-5_b), 3.60 – 3.76 (m, 2H, H-9), 3.84 – 3.95 (m, 1H, H-6), 4.51 (s, 2H, H-10), 4.98 (br s, 1H, H-4), 7.26 – 7.39 (m, 5H, H-12, H-12', H-13, H-13', H-14); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 28.5 (C-1, C-1', C-1''), 34.0 (C-8), 46.5 (C-5), 68.9 (C-10), 71.0 (C-6), 73.5 (C-9), 79.5 (C-2), 127.8 (C-12^{*}, C-12^{*}), 128.0 (C-14), 128.6 (C-13^{*}, C-13^{*}), 137.9 (C-11), 156.7 (C-3); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 350.2 (100) [M+Na]⁺, 328.2 (7) [M+H]⁺; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): C₁₇H₃₀NO₅ 328.2118 [M+H]⁺; gemessen: 328.2118 [M+Na]⁺; IR: ν_{\max} = 1028, 1184, 1260, 1468, 1539, 1633, 1660, 2364, 2922, 3362 cm⁻¹. * Zuordnung nicht gesichert.

318.2 (100) $[M+Na]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $C_{16}H_{25}NO_4Na$ 318.1676 $[M+Na]^+$; gemessen: 318.1685 $[M+Na]^+$; IR: ν_{max} = 698, 1094, 1167, 1250, 1366, 1686, 2363, 2931, 3367 cm^{-1} . * Zuordnung nicht gesichert.

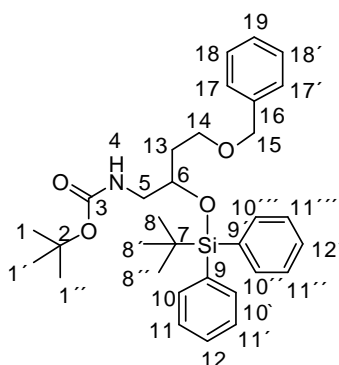


4.3.4.36 *tert*-Butyl-(4-(benzyloxy)-2-((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)butyl)carbamate (179e) [CK 283]

Zu einer Lösung aus dem Alkohol **179d** (1.13 g, 3.83 mmol) und Imidazol (0.78 g, 11.49 mmol) in absolutem CH_2Cl_2 (25 mL) wurde bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid (TBDPS-Cl) (2.11 g, 7.66 mmol) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde für 72 h bei r.t. gerührt. Nach der Zugabe von Et_2O (75 mL) wurde die organische Phase mit verdünnter HCl (3 x 20 mL, $c \approx 1$ M in H_2O), gesättigter wässriger $NaHCO_3$ -Lösung (3 x 20 mL), Wasser (3 x 20 mL) und gesättigter wässriger NaCl-Lösung (2 x 20 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über $MgSO_4$ wurden die LM unter vermindertem Druck abdestilliert. Aufreinigung des Rohprodukts mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , c -Hexan/ $EtOAc$, 9/1, v/v , R_f = 0.8) ergab den Silylether **179e** (2.66 g, 91%) als farbloses Öl; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.03 (s, 9H, H-8, C-8', C-8''), 1.82 (ddd, 2J = 14.1 Hz, 3J = 8.5 Hz, 3J = 5.6 Hz, 1H, H-13_a), 1.97 (ddd, 2J = 14.1 Hz, 3J = 7.2 Hz, 3J = 4.8 Hz, 1H, H-13_b), 3.09 (dd, 2J = 8.5 Hz, 3J = 7.1 Hz, 1H, H-5_a), 3.46 (dd, 2J = 8.5 Hz, 3J = 8.5 Hz, 1H, H-5_b), 3.75 (ddd, 2J = 10.6 Hz, 3J = 7.2 Hz, 3J = 5.6 Hz, 1H, H-14_a), 3.84 (ddd, 2J = 10.6 Hz, 3J = 8.5 Hz, 3J = 4.8 Hz, 1H, H-14_b), 4.38 (d, 2J = 14.8 Hz, 1H, H-15_a), 4.44 (d, 2J = 14.8 Hz, 1H, H-15_b), 4.72 (m, 1H, H-6), 7.25 – 7.47 (m, 11H, H-11, H-11', H-11'', H-11''', H-12, H-12', H-17, H-17', H-18, H-18', H-19), 7.58 – 7.66 (m, 4H, H-10, H-10', H-10'', H-10'''); ^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 19.2 (C-7), 26.93 (C-1, C-1'', C-1''', C-8, C-8', C-8''), 37.8 (C-13), 48.5 (C-5), 49.7 (C-14), 59.8 (C-15), 71.5 (C-6), 82.6 (C-2), 127.86 (C-11*, C-11*), 127.88 (C-11'', C-11'''), 128.1 (C-19*), 128.3 (C-17*, C-17*), 128.9 (C-18*, C-18*), 133.3 (C-12*, C-12*), 133.5 (C-9*, C-9*), 135.57 (C-10*, C-10*), 135.60 (C-10'', C-10'''), 135.9 (C-16), 158.2 (C-3); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 556.3 (100) $[M+Na]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $C_{32}H_{43}NO_4SiNa$ 556.2854 $[M+Na]^+$; gemessen: 556.2854 $[M+Na]^+$; IR: ν_{max} = 489,

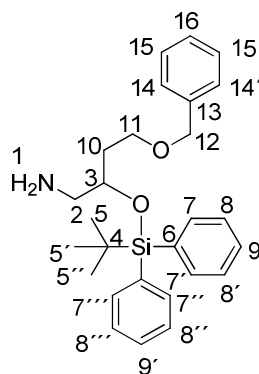
504, 611, 699, 736, 762, 1084, 1108, 1427, 1691, 2341, 2360, 2856, 2930 cm⁻¹.

* Zuordnung nicht gesichert.



4.3.4.37 4-(Benzyloxy)-2-((tert-butyl)diphenylsilyl)oxy)butan-1-amin (179f) [CK 288]¹⁴⁸

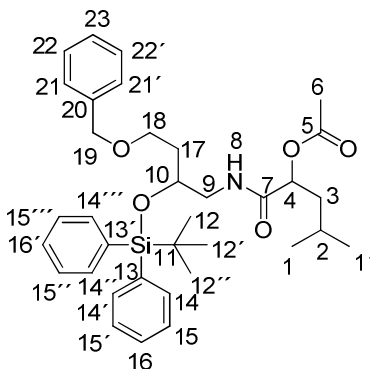
Zu einer Lösung aus dem Silylether **179e** (2.66 g, 4.98 mmol) in CH₂Cl₂ (50 mL) wurde bei 0 °C TFA (5 mL) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde für 6 h bei 0 °C gerührt. Nach der Zugabe von gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung (40 mL) wurden die Phasen separiert. Die wässrige Phase wurde mit CH₂Cl₂ (3 x 20 mL) extrahiert, und vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet. Nach dem Abdestillieren des LM unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (SiO₂, EtOAc + 1 Vol% Et₃N, R_f= 0.3) aufgereinigt. Erhalten wurde das Amin **179f** (0.67 g, 31%) als farbloses Öl; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 1.06 (s, 9H, H-5, H-5', H-5''), 1.35 (br s, 2H, H-1), 1.78 – 1.87 (m, 2H, H-10'), 2.62 (dd, ²J= 13.4 Hz, ³J= 4.9 Hz, 1H, H-2_a), 2.72 (dd, ²J= 13.4 Hz, ³J= 4.5 Hz, 1H, H-2_b), 3.36 – 3.52 (m, 2H, H-11), 3.80 – 3.91 (m, 1H, H-3), 4.34 (s, 2H, H-12), 7.20 – 7.46 (m, 11H, H-8, H-8', H-8'', H-8''', H-9, H-9', H-14, H-14', H-15, H-15', H-16), 7.63 – 7.72 (m, 4H, H-7, H-7', H-7'', H-7'''); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ= 19.6 (C-4), 27.2 (C-5, C-5', C-5''), 34.5 (C-10), 47.6 (C-2), 66.9 (C-12), 72.8 (C-3), 73.0 (C-11), 127.7 (C-8*, C-8'*), 127.8 (C-8''*, C-8'''*), 128.5 (C-16*), 129.80 (C-14*, C-14'*), 129.81 (C-15*, C-15'*), 134.2 (C-6*), 134.3 (C-6'*), 135.9 (C-9*, C-9'*), 136.0 (C-7*, C-7'*), 138.5 (C-13); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 434.3 (100) [M+H]⁺; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): C₂₇H₃₅NO₂SiNa 456.2329 [M+Na]⁺; gemessen: 456.2332 [M+Na]⁺; IR: ν_{max}= 486, 504, 698, 1103, 1588, 2359, 2856, 2930 cm⁻¹. * Zuordnung nicht gesichert.



4.3.4.38 1-((4-(Benzyloxy)-2-((tert-butyl)diphenylsilyl)oxy)butyl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl acetat (**180a**) [CK 294]

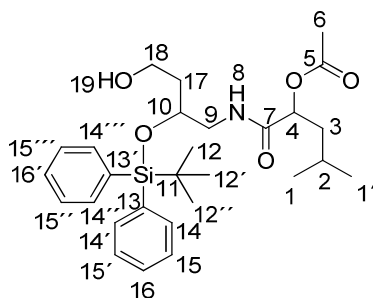
Analog AAV 1 wurden bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre zu einer Lösung aus der Säure **80b** (0.43 g, 2.47 mmol) in wasserfreiem CH₂Cl₂ (20 mL) EDC-HCl (0.57 g, 2.96 mmol) und HOBt (0.45 g, 2.96 mmol) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde für 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde eine Lösung aus dem Amin **179f** (1.07 g, 2.47 mmol) in wasserfreiem CH₂Cl₂ (50 mL) und katalytische Mengen an 4-DMAP zugegeben, und die Reaktion wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit EtOAc (100 mL) verdünnt, und die organische Phase wurde mit gesättigter wässriger NH₄Cl-Lösung (2 x 15 mL), gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung (2 x 15 mL) und gesättigter wässriger NaCl-Lösung (2 x 15 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Na₂SO₄ wurde das LM unter vermindertem Druck abdestilliert. Reinigung mittels Säulenchromatographie (SiO₂, *n*-Hexan/ EtOAc, 8/2, v/v, R_f = 0.18) ergab das Amid **180a** (5.19 g, 81%) als farbloses Öl in zwei Rotameren; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.87 – 0.94 (m, 6H, H-1, H-1'), 1.06 und 1.07 (zwei s, 9H, H-11, H-11', H-11''), 1.59 – 1.86 (m, 5H, H-2, H-3, H-17), 3.14 – 3.25 (m, 1H, H-9_a), 3.35 – 3.56 (m, 3H, H-9_b, H-18), 4.01 – 4.12 (m, 1H, H-10), 4.34 (s, 2H, H-19), 5.08 – 5.16 (m, 1H, H-4), 6.34 – 6.44 (m, 1H, H-8), 7.17 – 7.47 (m, 11H, H-15, H-15', H-15'', H-15''', H-16, H-16', H-21, H-21', H-22, H-22', H-23), 7.61 – 7.70 (m, 4H, H-14, H-14', H-14'', H-14'''); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 19.5 (C-11), 20.93 und 20.94 (C-6), 21.86 und 21.94 (C-1'), 23.25 und 23.29 (C-1''), 24.69 und 24.73 (C-2), 27.13 und 27.16 (C-12, C-12', C-12''), 34.5 und 34.7 (C-17), 41.0 und 41.1 (C-3), 43.5 und 43.8 (C-9), 66.3 und 66.4 (C-19), 66.7 und 66.8 (C-18), 73.00 und 73.02 (C-10'), 73.04 (C-4'), 127.70 und 127.72 (C-23'), 127.76 und 127.88 (C-15*, C-15', C-15'', C-15'''), 127.97 (C-21*, C-21'), 128.00 (C-22*, C-22'), 133.66 und 133.70 (C-13*), 133.73 und 133.77 (C-13'), 135.80 und 135.84 (C-14*, C-14', C-14'', C-14'''), 135.9 (C-16*, C-16'), 138.35 und 138.36 (C-20*), 169.80 und 169.83 (C-7*), 170.38 und 170.41 (C-5*); MS (ESI, 10 eV, *m/z* (%)): 612.3 (100) [M+Na]⁺; HR-MS (ESI, 10 eV, *m/z*):

$C_{35}H_{47}NO_5SiNa$ 612.3116 $[M+Na]^+$; gemessen: 612.3117 $[M+Na]^+$; IR: ν_{\max} = 504, 700, 738, 1104, 1471, 1522, 1682, 1743, 2957 cm^{-1} . * Zuordnung nicht gesichert.



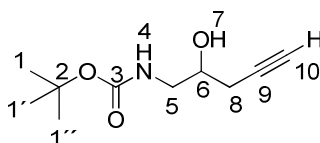
4.3.4.39 1-((2-((tert-Butyl)diphenylsilyl)oxy)-4-hydroxybutyl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl acetat (**180b**) [CK 297]

Analog zu AAV 6 wurde eine Suspension aus dem Benzylester **180a** (0.84 g, 1.42 mmol) und Palladium (0.08 g, 10% aktiviert auf Kohlenstoff) in absolutem Ethanol (10 mL) über Nacht unter H_2 -Atmosphäre (1 bar) bei r.t. gerührt. Die Suspension wurde durch Celite® 545 filtriert, und der Filterkuchen wurde mit EtOAc (20 mL) gespült. Durch Entfernen der LM der vereinigten organischen Phasen unter vermindertem Druck wurde die Säure **180b** (0.51 g, 71%) als farbloses Öl in zwei Rotameren erhalten; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 0.87 – 0.93 (m, 6H, H-1, H-1'), 1.06 (s, 9H, H-12, H-12', H-12''), 1.57 – 1.72 (m, 5H, H-2, H-3, H-17), 2.02 (s, 3H, H-6), 2.27 (br s, 1H, H-19), 3.18 – 3.29 (m, 1H, H-9_a*), 3.40 – 3.54 (m, 2H, H-18*), 3.56 – 3.63 (m, 1H, H-9_b*), 5.08 – 5.16 (H-4), 6.43 – 6.51 (br m, 1H, H-8), 7.34 – 7.46 (m, 6H, H-15, H-15', H-15'', H-15''', H-16, H-16'), 7.62 – 7.69 (m, 4H, H-14, H-14', H-14'', H-14'''); ^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 19.4 (C-11), 20.87 und 20.91 (C-6), 21.75 und 21.83 (C-1*), 23.1 und 23.2 (C-1*), 24.59 und 24.62 (C-2), 27.03 und 27.06 (C-12, C-12', C-12''), 37.0 und 37.1 (C-3), 43.9 und 44.1 (C-9), 58.86 und 58.89 (C-18), 70.3 und 70.4 (C-10*), 72.85 und 72.90 (C-4*), 127.8 (C-15*, C-15*), 127.93 und 127.96 (C-15'', C-15'''), 129.99 und 130.05 (C-16*), 130.06 und 130.09 (C-16'), 133.39 und 133.44 (C-13*), 133.55 und 133.61 (C-13'), 135.97 und 135.71 (C-14*, C-14'), 135.78 und 135.85 (C-14'', C-14'''), 169.80 und 169.82 (C-7*), 170.68 und 170.77 (C-5*); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 522.3 (100) $[M+Na]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $C_{28}H_{41}NO_5SiNa$ 522.2646 $[M+Na]^+$; gemessen: 522.2639 $[M+Na]^+$; IR: ν_{\max} = 486, 504, 610, 701, 1104, 1219, 1661, 2360, 2956 cm^{-1} . * Zuordnung nicht gesichert.



4.3.4.40 tert-Butyl-(2-hydroxypent-4-in-1-yl)carbamate (**87a**) [CK 202]^{129,130}

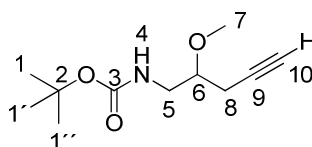
Zu einer Suspension aus Magnesiumspänen (0.24 g, 9.87 mmol), HgCl_2 (4.52 mg, 16.65 μmol) und Iod (12.90 mg, 101.65 μmol) in wasserfreiem Et_2O (5 mL) wurde unter Ar-Atmosphäre einige Tropfen Propargylbromid (**86**) zugegeben. Nach Einsetzen der Reaktion wurde auf 0 °C abgekühlt und eine Lösung aus Propargylbromid (**86**) (1.03 mL, 9.29 mmol) und *N*-(tert-Butyloxycarbonyl)-glycinal (**85**) (0.53 g, 3.32 mmol) in wasserfreiem Et_2O (9 mL) langsam zugetropft. Nach dem Rühren der Reaktionssuspension für 20 h bei r.t. wurden die festen Bestandteile abfiltriert. Nach der Zugabe von gesättigter wässriger NH_4Cl -Lösung (40 mL) wurde die organische Phase separiert. Die wässrige Phase wurde mit Et_2O (3 x 20 mL) extrahiert, und die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet. Nachdem Abdestillieren des LM unter vermindertem Druck, wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , *c*-Hexan/ EtOAc , 3/2, v/v, R_f = 0.46) aufgereinigt. Erhalten wurde der Alkohol **87a** (0.26 g, 40%) als farbloses Öl; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.49 (s, 9H, H-1, H-1', H-1''), 1.60 (br s, 1H, H-7), 2.05 (t, 4J = 2.7 Hz, 1H, H-10), 2.41 (dd, 3J = 6.3 Hz, 4J = 2.7 Hz, 2H, H-8), 3.14 – 3.24 (m, 1H, H-5_a), 3.36 – 3.45 (m, 1H, H-5_b), 3.88 (ddd, 3J = 9.7 Hz, 3J = 6.3 Hz, 3J = 3.3 Hz, 1H, H-6), 4.95 (br s, 1H, H-4).



4.3.4.41 tert-Butyl-(2-methoxypent-4-in-1-yl)carbamate (**87b**) [CK 233]¹³¹

Zu einer Suspension aus NaH (0.17 g, 4.29 mmol, 60% in Mineralöl) in wasserfreiem THF (13 mL) wurde bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre eine Lösung aus dem Alkohol **87a** (0.57 g, 2.86 mmol) in wasserfreiem THF (5 mL) zugetropft, und die Suspension wurde für 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde Iodmethan (2.68 mL, 42.90 mmol) bei 0 °C zugegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Nach der Zugabe von gesättigter wässriger NH_4Cl -Lösung (20 mL) wurde die Reaktionslösung mit Et_2O (3 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen

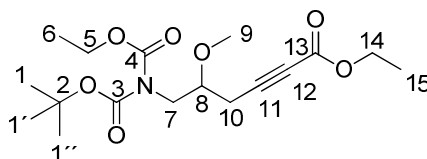
wurden über Na_2SO_4 getrocknet, und die LM wurden unter vermindertem Druck abdestilliert. Durch Aufreinigung des Rohprodukts mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , $\text{EtOAc}/c\text{-Hexan}$, 1/3, v/v, $R_f = 0.44$) wurde der Methylether **87b** (0.32 g, 52%) als farbloses Öl erhalten; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.44$ (s, 9H, H-1, H-1', H-1''), 2.02 (t, $^4J = 2.7$ Hz, 1H, H-10), 2.43 (dd, $^3J = 5.0$ Hz, $^4J = 2.7$ Hz, 2H, H-8), 3.13 – 3.26 (m, 1H, H-5_a), 3.38 – 3.46 (m, 5H, H-5_b, H-6, H-7), 4.83 (br s, 1H, H-4), $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 21.3$ (C-8), 28.5 (C-1, C-1', C-1''), 43.2 (C-5), 57.5 (C-7), 70.7 (C-6), 77.4 (C-10), 78.1 (C-2), 80.1 (C-9), 156.0 (C-3); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 236.1 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NO}_3\text{Na}$ 236.1257 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gemessen: 236.1253 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR: $\nu_{\text{max}} = 1111, 1249, 1366, 1507, 1698, 2359, 2977, 3299 \text{ cm}^{-1}$.



4.3.4.42 6-((tert-Butyloxycarbonyl)ethyloxycarbonyl)amino)-5-methoxy-hex-2-ino-säureethylester (**170a**) [CK 238]¹³²

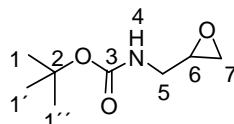
Zu einer Lösung aus dem Alkin **87b** (0.32 g, 1.50 mmol) in wasserfreiem THF (11 mL) wurde bei -78°C unter Ar-Atmosphäre $n\text{-BuLi}$ (1.32 mL, 3.30 mmol, $c = 2.5$ M in $n\text{-Hexan}$) zugetropft, und die Reaktionslösung wurde für 30 min bei -78°C gerührt. Nach der Zugabe von Chloressigsäureethylester (0.35 mL, 3.30 mmol) bei -78°C wurde die Reaktionslösung für 1 h bei gleicher Temperatur und für 15 min bei 0°C gerührt. Nach der Zugabe von gesättigter wässriger NH_4Cl -Lösung (5 mL) wurde die Reaktionslösung mit Et_2O (3 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger NaCl -Lösung (2 x 10 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Nach dem Abdestillieren der organischen LM unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , $\text{EtOAc}/c\text{-Hexan}$, 1/3, v/v, $R_f = 0.22$) aufgereinigt. Erhalten wurde der Ethylester **170a** (0.40 g, 76%) als farbloses Öl; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.23$ (t, $^3J = 6.2$ Hz, 3H, H-15^{*}), 1.26 (t, $^3J = 6.2$ Hz, 3H, H-6^{*}), 1.45 (s, 9H, H-1, H-1', H-1''), 2.48 (d, $^3J = 5.8$ Hz, 2H, H-10), 3.34 (s, 3H, H-9), 3.57 (ddd, $^3J = 7.1$ Hz, $^3J = 5.8$ Hz, $^3J = 5.2$ Hz, 1H, H-8), 3.67 (dd, $^2J = 14.3$ Hz, $^3J = 5.2$ Hz, 1H, H-7_a), 3.82 (dd, $^3J = 14.3$ Hz, $^3J = 7.1$ Hz, 1H, H-7_b), 4.14 (q, $^3J = 6.2$ Hz, 2H, H-14^{*}), 4.20 (q, $^3J = 6.2$ Hz, 2H, H-5^{*}); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 14.2$ (C-15^{*}), 14.4 (C-6^{*}), 22.5 (C-10), 28.1 (C-1, C-1', C-1''), 48.9 (C-7), 58.3 (C-9), 62.0 (C-14^{*}), 63.2 (C-5^{*}), 74.6 (C-8), 77.5 (C-12), 83.2 (C-2), 85.1 (C-11), 152.3 (C-3), 153.6 (C-13^{*}), 154.3 (C-4^{*}); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 380.2 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z):

$C_{17}H_{27}NO_7Na$ 380.1680 $[M+Na]^+$; gemessen: 380.1672 $[M+Na]^+$; IR: ν_{max} = 1074, 1109, 1153, 1248, 1368, 1706, 1747, 2361, 2981 cm^{-1} . * Zuordnung nicht gesichert.



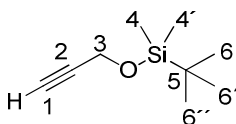
4.3.4.43 *tert*-Butyl-(oxiran-2-ylmethyl)carbamat (**175**) [CK 183]¹³⁶

Zu einer Lösung aus *tert*-Butyl-*N*-allylcarbamat (**174**) (3.14 g, 19.97 mmol) in CH_2Cl_2 (200 mL) wurde bei 0 °C *m*-Chlorperbenzoesäure (6.88 g, 39.96 mmol) portionsweise zugegeben, und die Reaktionslösung wurde für 48 h bei r.t. gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Na_2SO_3 -Lösung (100 mL, 10% in H_2O), gesättigter wässriger $NaHCO_3$ -Lösung (100 mL) und gesättigter wässriger $NaCl$ -Lösung (2 x 100 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über $MgSO_4$ wurde das LM unter vermindertem Druck abdestilliert. Erhalten wurde das Oxiran **175** (3.20 g, 92%) als ein farbloses Öl; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.44 (s, 9H, H-1, H-1', H-1''), 2.58 (dd, 2J = 4.7 Hz, 3J = 2.7 Hz, 1H, H-7_a), 2.77 (dd, 2J = 4.7 Hz, 3J = 4.0 Hz, 1H, H-7_b), 3.04 – 3.14 (br m, 1H, H-6), 3.20 (ddd, 2J = 14.7 Hz, 3J = 6.3 Hz, 3J = 5.1 Hz, 1H, H-5_a), 3.52 (br d, 2J = 14.7 Hz, 1H, H-5_b), 4.74 (br s, 1H, H-4).



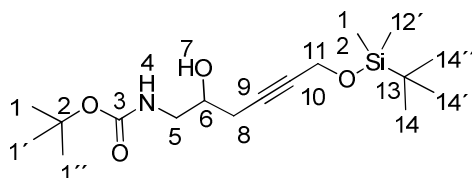
4.3.4.44 *tert*-Butyldimethyl-(prop-2-in-1-yloxy)-silan (**176b**) [CK 194]¹⁶⁹

Zu einer Lösung aus 2-Propin-1-ol (**176a**) (2.50 g, 44.59 mmol) in wasserfreiem CH_2Cl_2 (125 mL) wurden bei r.t. unter Ar-Atmosphäre Imidazol (111.63 mmol) und TBS-Cl (8.08 g, 53.61 mmol) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde für 30 min bei r.t. gerührt. Nach der Zugabe von Wasser (50 mL) wurden die Phasen separiert, und die wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 (2 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (20 mL) und gesättigter wässriger $NaCl$ -Lösung (20 mL) gewaschen und über $MgSO_4$ getrocknet. Nach dem Entfernen des LM unter vermindertem Druck wurde der geschützte Alkohol **176b** (7.82 g, 77%) als farbloses Öl erhalten und ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 0.11 (s, 6H, H-4, H-4'), 0.91 (s, 9H, H-6, H-6', H-6''), 2.38 (t, 4J = 2.4 Hz, 1H, H-1), 4.31 (d, 4J = 2.4 Hz, 2H, H-3).



4.3.4.45 *tert*-Butyl-(6-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-2-hydroxyhex-4-in-1-yl)carbamat (177) [CK 200]¹³⁷

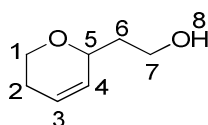
Zu einer Lösung aus dem Alkin **176b** (2.07 g, 12.12 mmol) in wasserfreiem Toluol (50 mL) wurde bei -20 °C unter Ar-Atmosphäre *n*-BuLi (4.62 mL, 11.55 mmol, $c = 2.5$ M in *n*-Hexan) zugetropft, und die Reaktionslösung wurde für 20 min bei gleicher Temperatur und anschließend für 5 min bei 0 °C gerührt. Nach der Zugabe von Dimethylaluminiumchlorid (1.07 mL, 11.56 mmol, $c = 1$ M in *n*-Hexan) bei 0 °C wurde die entstandene Suspension für 1 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre die Suspension zu einer Lösung aus dem Epoxid **175** (1.00 g, 5.77 mmol) in wasserfreiem Toluol (50 mL) langsam zugetropft, und die Suspension wurde 165 min bei 0 °C gerührt. Nach der Zugabe von gesättigter wässriger NaF-Lösung (10 mL) bei 0 °C wurde die Reaktion für 60 min bei r.t. gerührt. Nach der Zugabe von CH₂Cl₂ (100 mL) wurde die organische Phase separiert und über MgSO₄ getrocknet. Nach dem Entfernen der organischen LM unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (SiO₂, EtOAc/ *c*-Hexan, 1/3, v/v, $R_f = 0.32$) aufgereinigt. Erhalten wurde der sekundäre Alkohol **177** (0.41 g, 41%) als farbloses Öl; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 0.07$ (s, 6H, H-12, H-12'), 0.87 (s, 9H, H-14, H-14', H-14''), 1.41 (s, 9H, H-1, H-1', H-1''), 2.36 – 2.40 (m, 2H, H-8), 3.12 (dd, $^2J = 14.8$ Hz, $^3J = 6.2$ Hz, 1H, H-5_a), 3.30 – 3.41 (m, 2H, H-5_b, H-6), 3.81 (br s, 1H, H-7), 4.26 (t, $^4J = 2.1$ Hz, 2H, H-11), 5.07 (br s, 1H, H-4); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = -5.01$ (C-12, C-12'), 18.4 (C-13), 25.9 (C-14, C-14', C-14''), 27.0 (C-8), 28.4 (C-1, C-1', C-1''), 45.1 (C-5), 51.9 (C-11), 70.0 (C-6), 79.8 (C-2), 81.0 (C-9), 81.4 (C-10), 157.1 (C-3); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 366.2 (100) [M+Na]⁺; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): C₁₇H₃₃NO₄SiNa 366.2071 [M+Na]⁺; gemessen: 366.2073 [M+Na]⁺; IR: $\nu_{\max} = 1167, 1217, 1366, 1523, 1738, 2359, 2970, 3368$ cm⁻¹.



4.3.5 Substrate zur Analyse der Pyranbiosynthese der Misakinolid A PKS

4.3.5.1 2-(2'-Hydroxyethyl)-5,6-dihydro-2H-pyran (**97b**) [CK 211]^{90,91}

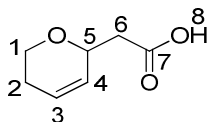
Das Pyranderivat **97b** (0.41 g, 7%) wurde entsprechend der Literatur ausgehend von 1,3-Propandiol **92a** über neun Stufen synthetisiert; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 1.70 – 1.86 (m, 2H, H-6), 1.87 – 1.97 (m, 1H, H-2_a), 2.25 – 2.37 (m, 1H, H-2_b), 2.46 (br s, 1H, H-8), 3.65 (ddd, ²J= 11.2 Hz, ³J= 10.2 Hz, ³J= 3.8 Hz, 1H, H-1_a), 3.79 (dt, ²J= 11.3 Hz, ³J= 5.6 Hz, 2H, H-7), 4.00 (br dd, ²J= 11.2 Hz, ³J= 5.7 Hz, 1H, H-1_b), 4.33 (m, 1H, H-5), 5.59 (dddd, ³J= 10.2 Hz, ³J= 4.0 Hz, ³J= 4.0 Hz, ³J= 1.6 Hz, 1H, H-4), 5.84 – 5.91 (m, 1H, H-3).



4.3.5.2 2-(2'-Carboxyethyl)-5,6-dihydro-2H-pyran (**98**) [CK 232]¹⁷⁰

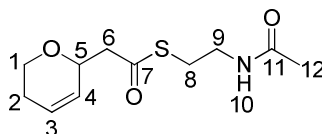
Herstellung Jones-Reagenz: Zu einer Lösung aus frisch gemörsertem CrO₃ (5.36 g, 26.8 mmol) in konzentrierter H₂SO₄ (4.6 mL) wurde langsam Wasser (14.4 mL) zugegeben.

Zu einer Lösung aus dem Alkohol **97b** (0.41 g, 3.20 mmol) in Aceton (5 mL) wurde bei 0 °C Jones-Reagenz (12 mL, c= 2.67 M) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde für 2 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit Wasser (15 mL) und CH₂Cl₂ (30 mL) verdünnt, und die organische Phase wurde separiert. Nach dem Waschen der organischen Phase mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung (3 x 5 mL) wurde die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet. Nach dem Entfernen des LM unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO₂, EtOAc/ *c*-Hexan, 1/1, v/v + 2 Vol% AcOH, R_f= 0.51) aufgereinigt. Erhalten wurde die Säure **98** (0.15 g, 33%) als farbloses Öl; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 1.93 – 2.03 (m, 1H, H-2_a), 2.22 – 2.34 (m, 1H, H-2_b), 2.53 (dd, ²J= 15.5 Hz, ³J= 5.2 Hz, 1H, H-6_a), 2.61 (dd, ²J= 15.5 Hz, ³J= 8.3 Hz, 1H, H-6_b), 3.71 (ddd, ²J= 11.3 Hz, ³J= 9.3, ³J= 4.0 Hz, 1H, H-1_a), 3.99 (br ddd, ²J= 11.3 Hz, ³J= 5.5 Hz, ³J= 2.9 Hz, 1H, H-1_b), 4.51 – 4.58 (m, 1H, H-5), 5.65 (ddd, ³J= 10.3 Hz, ³J= 4.0 Hz, ³J= 1.8 Hz, 1H, H-4), 5.88 – 5.95 (m, 1H, H-3); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): 25.0 (C-2), 40.2 (C-6), 63.4 (C-1), 70.5 (C-5), 126.4 (C-3), 128.3 (C-4), 176.2 (C-7); MS (ESI, 10 eV, *m/z* (%)): 141.1 (100) [M-H]⁻; HR-MS (ESI, 10 eV, *m/z*): C₇H₉O₃ 141.0546 [M-H]⁻; gemessen: 141.0554 [M-H]⁻; IR: ν_{max}= 1061, 1084, 1166, 1211, 1272, 1708, 2923, 3035 cm⁻¹.



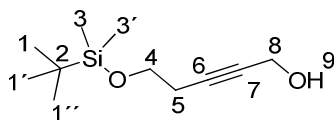
4.3.5.3 *S*-(2-Acetamidoethyl) 2-(5,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)ethanethioate (**90**) [CK 250]

Analog zu AAV 3 wurde bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre zu einer Lösung aus der Säure **98** (0.15 g, 1.06 mmol) in wasserfreiem CH₂Cl₂ (15 mL) EDC-HCl (0.24 g, 1.27 mmol) und HOBT (0.19 g, 1.27 mmol) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde für 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurden *N*-Acetylcysteamin (**120**) (0.16 g, 2.49 mmol) und katalytische Mengen an 4-DMAP zugegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Nach der Zugabe von gesättigter wässriger NH₄Cl-Lösung (10 mL) wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase wurde mit CH₂Cl₂ (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen und anschließend über Na₂SO₄ getrocknet. Nach dem Abdestillieren des LM unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO₂, EtOAc, R_f = 0.28) aufgereinigt. Erhalten wurde der Thioester **90** (0.15 g, 60%) als weißer, wachsartiger Feststoff; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.90 – 1.99 (m, 4H, H-2_a, H-12), 2.17 – 2.29 (m, 1H, H-2_b), 2.66 (dd, ²J = 14.7 Hz, ³J = 4.7 Hz, 1H, H-6_a), 2.82 (dd, ²J = 14.7 Hz, ³J = 8.8 Hz, 1H, H-6_b), 3.01 – 3.07 (m, 2H, H-8), 3.39 – 3.44 (m, 2H, H-9), 3.65 (ddd, ²J = 11.4 Hz, ³J = 9.0 Hz, ³J = 4.1 Hz, 1H, H-1_a), 3.91 (br ddd, ²J = 11.3 Hz, ³J = 5.4 Hz, ³J = 3.3 Hz, 1H, H-1_b), 4.51 – 4.60 (m, 1H, H-5), 5.59 (ddd, ³J = 10.3 Hz, ³J = 4.0 Hz, ³J = 1.9 Hz, 1H, H-4), 5.85 – 5.92 (m, 1H, H-3), 6.09 (br s, 1H, H-10); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 23.2 (C-12), 25.0 (C-2), 28.7 (C-8), 39.6 (C-9), 49.3 (C-6), 63.1 (C-1), 70.9 (C-5), 126.3 (C-3), 128.3 (C-4), 170.6 (C-11), 197.4 (C-7); MS (ESI, 10 eV, *m/z* (%)): 266.1 (100) [M+Na]⁺; HR-MS (ESI, 10 eV, *m/z*): C₁₁H₁₇NO₃Na 266.0821 [M+Na]⁺; gemessen: 266.0831 [M+Na]⁺; IR: ν_{max} = 1217, 1229, 1366, 1739, 2340, 2360, 2970, 3016 cm⁻¹.



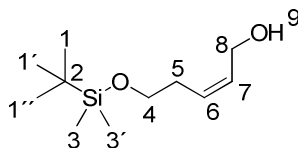
4.3.5.4 5-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)pent-2-yn-1-ol (**100**) [CK 188]^{151–153}

Der Alkinol **100** (1.40 g, 60%) wurde entsprechend der Literatur ausgehend von dem Alkin **94a** über zwei Stufen synthetisiert; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.07 (s, 6H, H-3, H-3'), 0.89 (s, 9H, H-1, H-1', H-1''), 1.66 (br s, 1H, H-9), 2.43 (tt, ³J = 7.2 Hz, ⁵J = 2.1 Hz, 2H, H-5), 3.72 (t, ³J = 7.2 Hz, 2H, H-4), 4.23 (t, ³J = 2.1 Hz, 2H, H-8).



4.3.5.5 cis-5-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)pent-2-en-1-ol (**184**) [CK 236]^{152,158}

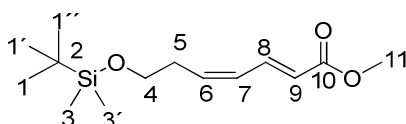
Zu einer Suspension aus $\text{Ni}(\text{OAc})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.29 g, 1.17 mmol) in MeOH (9 mL) wurde NaBH_4 (0.04 g, 1.17 mmol) portionsweise zugegeben. Anschließend wurde eine Lösung aus dem Alkin **100** (1.00 g, 4.67 mmol) in MeOH (5 mL) zugegeben, und die schwarze Suspension wurde über Nacht bei r.t. unter H_2 -Atmosphäre (1 bar) gerührt. Das LM wurde unter vermindertem Druck entfernt, und der Rückstand wurde in Et_2O (50 mL) suspendiert. Nach dem Filtrieren durch Kieselgel wurde das LM unter vermindertem Druck entfernt. Erhalten wurde das Alken **184** (0.86 g, 85%) als farbloses Öl; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 0.06 (s, 6H, H-3, H-3'), 0.90 (s, 9H, H-1, H-1', H-1''), 2.31 – 2.38 (m, 2H, H-5), 3.65 (t, 3J = 6.1 Hz, 2H, H-4), 4.14 (dd, 3J = 6.8 Hz, 4J = 1.1 Hz, 2H, H-8), 5.54 – 5.63 (m, 1H, H-7), 5.78 – 5.87 (m, 1H, H-6); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = -5.2 (C-3, C-3'), 18.6 (C-2), 26.1 (C-1, C-1', C-1''), 31.0 (C-5), 58.2 (C-8), 62.4 (C-4), 130.0 (C-6), 131.0 (C-7).



4.3.5.6 (2E,4Z)-7-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)hepta-2,4-diensäuremethylester (**185a**) [CK 239]¹¹⁸

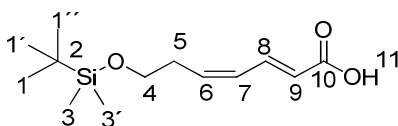
Oxalylchlorid (0.67 mL, 7.85 mmol) wurde bei -78 °C unter Ar-Atmosphäre zu einer Lösung aus DMSO (0.86 mL, 12.12 mmol) in absolutem CH_2Cl_2 (10 mL) langsam zugetropft, und die Reaktionslösung wurde für 15 min bei -78 °C gerührt. Anschließend wurde bei -78 °C eine Lösung aus dem Alkohol **184** (0.86 g, 3.98 mmol) in absolutem CH_2Cl_2 (2 mL) langsam zugetropft, und die Reaktionslösung wurde für 1 h bei -78 °C gerührt. NEt_3 (2.32 mL, 16.74 mmol) wurde langsam zugegeben, und die Reaktionslösung wurde auf r.t. erwärmt. Nach der Zugabe von Methoxycarbonylmethylen-triphenylphosphoran (**143b**) (2.66 g, 7.96 mmol) wurde die Reaktionslösung über Nacht bei r.t. gerührt. Die Reaktionslösung wurde durch Celite® 545 filtriert, und der Filterkuchen wurde mit EtOAc/ *c*-Hexan (50 mL, 1/9, v/v) gewaschen. Die LM der vereinigten organischen Fraktionen wurde unter vermindertem Druck entfernt, und das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , EtOAc/ *c*-Hexan, 1/9, v/v, R_f = 0.50) aufgereinigt. Erhalten wurde der Methylester **185a** (0.71 g, 66%) als farbloses Öl; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 0.05 (s, 6H, H-3, H-3'), 0.88 (s,

9H, H-1, H-1', H-1''), 2.49 – 2.56 (m, 2H, H-5), 3.68 (t, $^3J = 6.5$ Hz, 2H, H-4), 3.75 (s, 3H, H-11), 5.85 – 5.95 (m, 2H, H-9, H-6), 6.20 (dd, $^3J = 11.3$ Hz, $^3J = 11.3$ Hz, 1H, H-7), 7.60 (ddd, $^3J = 15.3$ Hz, $^3J = 11.3$ Hz, $^5J = 0.9$ Hz, 1H, H-8); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = -5.2$ (C-3, C-3'), 18.4 (C-2), 26.0 (C-1, C-1', C-1''), 32.0 (C-5), 51.7 (C-11), 62.4 (C-4), 121.3 (C-9), 128.1 (C-7), 137.9 (C-6), 139.9 (C-8), 167.8 (C-10); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 293.1 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{O}_3\text{SiNa}$ 293.1543 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gemessen: 293.1533 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR: $\nu_{\text{max}} = 1093, 1170, 1253, 1435, 1471, 1724, 2360, 2928, 2952 \text{ cm}^{-1}$.



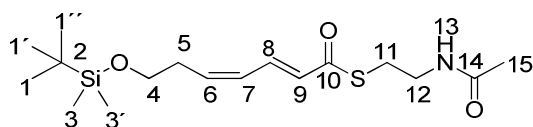
4.3.5.7 (2E,4Z)-7-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)hepta-2,4-diensäure (185b) [CK 241]¹⁵⁴

Zu einer Lösung aus dem Methylester **185a** (0.71 g, 2.63 mmol) in EtOH (17 mL) und THF (9 mL) wurde bei r.t. langsam LiOH (17 mL, $c \approx 0.75$ M in H_2O) gegeben, und die Reaktionslösung wurde für 90 min bei r.t. gerührt. Nachdem die organischen LM unter vermindertem Druck entfernt wurden, wurde die wässrige Phase mit NaHSO_4 ($c \approx 1$ M in H_2O) auf pH= 2 angesäuert und anschließend mit EtOAc (3 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, und das LM wurde unter vermindertem Druck entfernt. Aufreinigung des Rohprodukts mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , c -Hexan/ EtOAc, 3/1, v/v+1 Vol% AcOH, $R_f = 0.47$) ergab die Säure **185b** (0.18 g, 52%) als farbloses Öl; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.05$ (s, 6H, H-3, H-3'), 0.88 (s, 9H, H-1, H-1', H-1''), 2.50 – 2.57 (m, 2H, H-5), 3.70 (t, $^3J = 6.3$ Hz, 2H, H-4), 5.88 (d, $^3J = 15.2$ Hz, 1H, H-9), 5.97 (dt, $^3J = 10.8$ Hz, $^3J = 7.8$ Hz, 1H, H-6), 6.20 (dd, $^3J = 11.5$ Hz, $^3J = 10.8$ Hz, 1H, H-7), 7.70 (ddd, $^3J = 15.2$ Hz, $^3J = 11.5$ Hz, $^5J = 0.9$ Hz, 1H, H-8); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = -5.2$ (C-3, C-3'), 18.4 (C-2), 26.0 (C-1, C-1', C-1''), 32.0 (C-5), 62.3 (C-4), 120.9 (C-9), 128.0 (C-7), 139.1 (C-6), 142.0 (C-8), 172.7 (C-10); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 255.1 (100) $[\text{M}-\text{H}]^-$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{O}_3\text{Si}$ 255.1422 $[\text{M}-\text{H}]^-$; gemessen: 255.1414 $[\text{M}-\text{H}]^-$; IR: $\nu_{\text{max}} = 1178, 1278, 1416, 1702, 2341, 2360, 2858, 2929 \text{ cm}^{-1}$.



4.3.5.8 (2E,4Z)-S-(2-Acetamidoethyl)-7-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)hepta-2,4-dienthioat (**186**) [CK 242]

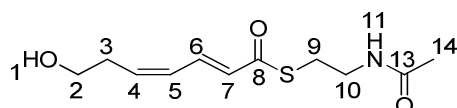
Analog zu AAV 3 wurden bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre zu einer Lösung aus der Säure **185b** (0.32 g, 1.25 mmol) in wasserfreiem CH₂Cl₂ (16 mL) EDC-HCl (0.28 g, 1.50 mmol) und HOBt (0.23 g, 1.50 mmol) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde für 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde N-Acetylcysteamin (**120**) (0.19 g, 1.50 mmol) und katalytische Mengen an 4-DMAP zugegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Nach der Zugabe von gesättigter wässriger NH₄Cl-Lösung (10 mL) wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase wurde mit CH₂Cl₂ (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen und anschließend über Na₂SO₄ getrocknet. Nach dem Abdestillieren des LM unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO₂, *c*-Hexan/ EtOAc, 4/6, *v/v*, R_f = 0.49) aufgereinigt. Erhalten wurde der Thioester **186** (0.18 g, 40%) als weißer, wachsartiger Feststoff; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.03 (s, 6H, H-3, H-3'), 0.86 (s, 9H, H-1, H-1', H-1''), 1.95 (s, 3H, H-15), 2.46 – 2.56 (m, 2H, H-5), 3.04 – 3.14 (m, 2H, H-11), 3.40 – 3.49 (m, 2H, H-12), 3.68 (t, ³J = 6.3 Hz, 2H, H-4), 5.92 – 6.29 (m, 4H, H-6, H-7, H-9, H-13), 7.53 (ddd, ³J = 15.1 Hz, ³J = 11.4 Hz, ⁵J = 0.8 Hz, 1H, H-8); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = -5.2 (C-3, C-3'), 18.4 (C-2), 23.3 (C-15), 26.0 (C-1, C-1', C-1''), 28.5 (C-11), 32.1 (C-5), 40.0 (C-12), 62.2 (C-4), 127.9 (C-9), 128.1 (C-7), 136.3 (C-6), 140.2 (C-8), 170.5 (C-14), 190.5 (C-10); MS (ESI, 10 eV, *m/z* (%)): 380.2 (100) [M+Na]⁺; HR-MS (ESI, 10 eV, *m/z*): C₁₇H₃₁O₃SSiNa 380.1686 [M+Na]⁺; gemessen: 380.1689 [M+Na]⁺; IR: ν_{max} = 1042, 1106, 1288, 1542, 1652, 2342, 2560, 2931, 3754 cm⁻¹.



4.3.5.9 (2E,4Z)-S-(2-Acetamidoethyl)-7-hydroxyhepta-2,4-dienthioat (**91**) [CK 245]¹¹⁰

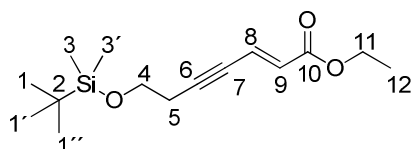
Eine Lösung aus dem TBS-Alkohol **186** (0.18 g, 0.49 mmol) in THF (15.0 mL), Pyridin (5.3 mL) und HF (1.5 mL, 70% HF in Pyridin) wurde für 6 h bei r.t. gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit EtOAc (30 mL) verdünnt und mit gesättigter wässriger NH₄Cl-Lösung (2 x 15 mL), HCl-Lösung (3 x 15 mL, *c* = 1.2 M in H₂O), gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung (3 x 15 mL) und gesättigter wässriger NaCl-Lösung (2 x 15 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Na₂SO₄ wurde das LM unter vermindertem Druck abdestilliert. Aufreinigung des Rohprodukts mittels Säulenchromatographie (SiO₂, EtOAc, R_f = 0.51) ergab den Thioester **91** (0.04 g, 34%) als wachsartigen, weißen Feststoff; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.97 (s, 3H, H-14),

2.00 (br s, 1H, H-1), 2.55 – 2.63 (m, 2H, H-3), 3.11 (t, $^3J = 6.3$ Hz, 2H, H-9), 3.42 – 3.50 (m, 2H, H-10), 3.73 (t, $^3J = 6.4$ Hz, 2H, H-2), 5.97 – 6.27 (m, 4H, H-4, H-5, H-7, H-11), 7.55 (ddd, $^3J = 15.1$ Hz, $^3J = 11.6$ Hz, $^5J = 0.9$ Hz, 1H, H-6); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 23.3$ (C-14), 28.6 (C-9), 32.0 (C-3), 39.9 (C-10), 61.7 (C-2), 128.5 (C-7*), 128.6 (C-5*), 135.9 (C-4), 139.5 (C-6), 170.7 (C-13), 190.6 (C-8); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 266.1 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{NO}_3\text{SNa}$ 266.0821 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gemessen: 266.0824 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR: $\nu_{\text{max}} = 1024, 1260, 1540, 1558, 1635, 1653, 2036, 2341, 2360, 2853, 2922, 3354 \text{ cm}^{-1}$. * Zuordnung nicht gesichert.



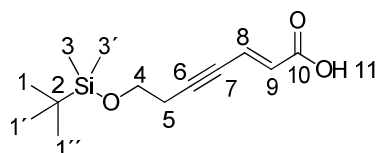
4.3.5.10 trans- 7-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)hept-2-en-4-insäureethylester (101a) [CK 191]¹⁸

Oxalylchlorid (0.40 mL, 4.66 mmol) wurde bei -78°C unter Ar-Atmosphäre zu einer Lösung aus DMSO (0.51 mL, 6.99 mmol) in CH_2Cl_2 (6 mL) langsam zugetropft, und die Reaktionslösung wurde für 15 min bei -78°C gerührt. Anschließend wurde bei -78°C eine Lösung aus dem Alkohol **100** (0.50 g, 2.33 mmol) in CH_2Cl_2 (2 mL) zugetropft, und die Reaktionslösung wurde für 1 h bei -78°C gerührt. Nach der tropfenweise Zugabe von NEt_3 (1.36 mL, 9.32 mmol) bei -78°C wurde die Reaktionslösung unter Erwärmen auf r.t. für 1 h gerührt. 2-(Triphenylphosphoranylidene)essigsäureethylester (**143a**) (1.63 g, 4.66 mmol) wurde zugegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Die Reaktionslösung wurde durch Celite® 545 filtriert, und der Filterkuchen wurde mit EtOAc/*c*-Hexan (50 mL, 1/9, v/v) gewaschen. Das LM der vereinigten organischen Fraktionen wurde unter vermindertem Druck entfernt, und das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , EtOAc/ *c*-Hexan, 1/9, v/v, $R_f = 0.46$) aufgereinigt. Erhalten wurde der Ethylester **101a** (0.46 g, 70%) als farbloses Öl; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.07$ (s, 6H, H-3, H-3'), 0.89 (s, 9H, H-1, H-1', H-1''), 1.29 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 3H, H-12), 2.59 (tdd, $^3J = 6.8$ Hz, $^5J = 2.2$ Hz, $^6J = 0.5$ Hz, 2H, H-5), 3.76 (t, $^3J = 6.9$ Hz, 2H, H-4), 4.20 (q, $^3J = 7.1$ Hz, 2H, H-11), 6.15 (dd, $^3J = 15.8$ Hz, $^6J = 0.5$ Hz, 1H, H-9), 6.74 (dt, $^3J = 15.8$ Hz, $^5J = 2.2$ Hz, 1H, H-8); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = -5.1$ (C-3, C-3'), 14.4 (C-12), 18.5 (C-2), 24.3 (C-5), 26.0 (C-1, C-1', C-1''), 60.8 (C-11), 61.6 (C-4), 79.0 (C-7), 97.7 (C-6), 125.9 (C-9), 129.8 (C-8), 166.2 (C-10); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 305.2 (73) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 283.2 (26) $[\text{M}+\text{H}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_3\text{SiNa}$ 305.1543 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gemessen: 305.1540 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR: $\nu_{\text{max}} = 1100, 1155, 1177, 1257, 1301, 1620, 1715, 2359, 2954 \text{ cm}^{-1}$.



4.3.5.11 *trans*-7-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)hept-2-en-4-insäure (**101b**) [CK 197]¹⁰³

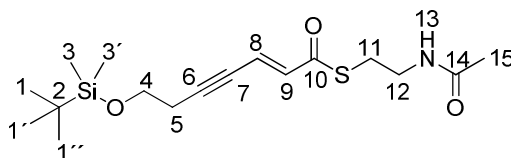
LiOH (0.25 g, 10.56 mmol) wurde bei 0 °C portionsweise zu einer Lösung aus dem Ester **101a** (0.57 g, 2.02 mmol) in Wasser (2 mL) und MeOH (6 mL) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde für 2 h bei r.t. gerührt. Das LM wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in EtOAc (20 mL) gelöst und mit gesättigter wässriger NH₄Cl (10 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit wässriger HCl (c= 1 M) auf pH= 2 angesäuert und mit EtOAc (3 x 10 mL) extrahiert. Nach dem Trocknen der vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ wurde das LM unter vermindertem Druck entfernt. Reinigung des Rohprodukts mittels Säulenchromatographie (SiO₂, EtOAc/ *c*-Hexan, 2/8, v/v + 1 Vol% AcOH, R_f= 0.57) ergab die Säure **101b** (0.27 g, 53%) als farbloses Öl; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 0.08 (s, 6H, H-3, H-3'), 0.90 (s, 9H, H-1, H-1', H-1''), 2.61 (td, ³J= 6.8 Hz, ⁵J= 2.3 Hz, 2H, H-5), 3.77 (t, ³J= 6.8 Hz, 2H, H-4), 6.14 (d, ³J= 15.8 Hz, 1H, H-9), 6.83 (dt, ³J= 15.8 Hz, ⁵J= 2.3 Hz, 1H, H-8), 10.99 (br s, 1H, H-11); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ= -5.2 (C-3, C-3'), 18.5 (C-2), 24.4 (C-5), 26.0 (C-1, C-1', C-1''), 61.5 (C-4), 78.9 (C-7), 99.7 (C-6), 128.5 (C-9), 129.0 (C-8), 171.6 (C-10); MS (ESI, 10 eV, *m/z* (%)): 253.2 (100) [M-H]⁻; HR-MS (ESI, 10 eV, *m/z*): C₁₃H₂₁O₃Si 253.1254 [M-H]⁻; gemessen: 253.1256 [M-H]⁻; IR: ν_{max}= 834, 1055, 1103, 1255, 1618, 1690, 2929 cm⁻¹.



4.3.5.12 *trans*-S-(2-Acetamidoethyl)-7-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)hept-2-en-4-in-thioat (**102a**) [CK 201]¹⁰⁴

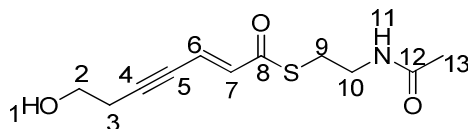
Analog zu AAV 3 wurden bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre zu einer Lösung aus der Säure **102a** (0.74 g, 2.91 mmol) in wasserfreiem CH₂Cl₂ (40 mL) EDC-HCl (0.66 g, 3.50 mmol) und HOBt (0.47 g, 3.50 mmol) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde für 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurden *N*-Acetylcysteamin (**120**) (0.42 g, 3.50 mmol) und katalytische Mengen an 4-DMAP zugegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Nach der Zugabe von gesättigter wässriger NH₄Cl-Lösung (10 mL) wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase wurde mit CH₂Cl₂ (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser

gewaschen und anschließend über Na_2SO_4 getrocknet. Nach dem Abdestillieren des LM unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO_2 , EtOAc, $R_f = 0.56$) aufgereinigt. Erhalten wurde der Thioester **102a** (0.77 g, 74%) als weißer, wachsartiger Feststoff; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.04$ (s, 6H, H-3, H-3'), 0.87 (s, 9H, H-1, H-1', H-1''), 1.93 (s, 3H, H-15), 2.56 (td, $^3J = 6.8$ Hz, $^5J = 2.3$ Hz, 2H, H-5), 3.08 (t, $^3J = 6.4$ Hz, 2H, H-11), 3.27 – 3.49 (m, 2H, H-12), 3.73 (t, $^3J = 6.8$ Hz, 2H, H-4), 6.18 (br s, 1H, H-13), 6.39 (d, $^3J = 15.6$ Hz, 1H, H-9), 6.65 (dt, $^3J = 15.6$ Hz, $^5J = 2.3$ Hz, 1H, H-8); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = -5.2$ (C-3, C-3'), 18.4 (C-2), 23.2 (C-15), 24.4 (C-5), 25.9 (C-1, C-1', C-1''), 28.7 (C-11), 39.6 (C-12), 61.4 (C-4), 79.0 (C-7), 99.3 (C-6), 122.6 (C-9), 135.4 (C-8), 170.5 (C-14), 189.4 (C-10); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 378.2 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 356.2 (16) $[\text{M}+\text{H}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_{17}\text{H}_{30}\text{O}_3\text{SSi}$ 356.1710 $[\text{M}+\text{H}]^+$; gemessen: 356.1706 $[\text{M}+\text{H}]^+$; IR: $\nu_{\text{max}} = 777, 8111, 836, 1020, 1104, 1255, 1550, 1599, 1654, 2217, 2928, 3289 \text{ cm}^{-1}$.



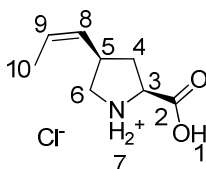
4.3.5.13 *trans-S-(2-Acetamidoethyl) 7-hydroxyhept-2-en-4-ynethioat* (**102b**) [CK 204]¹⁰

Eine Lösung aus dem Thioester **102a** (0.20 g, 0.56 mmol) in THF (20 mL), Pyridin (7 mL) und HF (2 mL, 70% HF in Pyridin) wurde für 5 h bei r.t. gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit EtOAc (30 mL) verdünnt und mit gesättigter wässriger NH_4Cl -Lösung (2 x 15 mL), HCl-Lösung (3 x 15 mL, $c = 1.2$ M in H_2O), gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lösung (3 x 15 mL) und gesättigter wässriger NaCl-Lösung (2 x 15 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Na_2SO_4 wurde das LM unter vermindertem Druck abdestilliert. Erhalten wurde der Alkohol **102b** (0.10 g, 71%) als farbloses Öl und wurde ohne weitere Aufreinigung verwendet; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.96$ (s, 3H, H-13), 2.09 (br s, 1H, H-1), 2.66 (td, $^3J = 6.3$ Hz, $^5J = 2.2$ Hz, 2H, H-3), 3.11 (t, $^3J = 6.4$ Hz, 2H, H-9), 3.41 – 3.20 (m, 2H, H-10), 3.78 (t, $^3J = 6.3$ Hz, 2H, H-2), 6.00 (br s, 1H, H-11), 6.45 (d, $^3J = 15.6$ Hz, 1H, H-7), 6.69 (dt, $^3J = 15.6$ Hz, $^5J = 2.2$ Hz, 1H, H-6); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 23.3$ (C-13), 24.3 (C-3), 28.7 (C-9), 39.7 (C-10), 60.8 (C-2), 79.5 (C-5), 98.5 (C-4), 122.3 (C-7), 135.8 (C-6), 170.6 (C-12), 189.5 (C-8); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 264.1 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{O}_3\text{SNa}$ 264.0665 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gemessen: 264.0671 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR: $\nu_{\text{max}} = 1023, 1040, 1269, 1288, 1541, 1600, 1651, 2359, 3310 \text{ cm}^{-1}$.



4.3.6 Synthese von *cis*-(*Z*)-4-Propenylprolin Hydrochlorid (**109**)^{48,92}

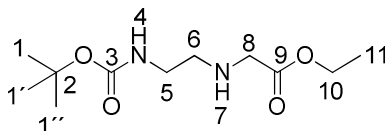
Das Prolinderivat **109** (0.03 g, 26%) wurde ausgehend von *trans*-4-Hydroxyprolin (**103**) über neun lineare Stufen entsprechend der Literatur synthetisiert; ¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ = 1.47 (dd, ³*J*= 6.9 Hz, ⁴*J*= 1.9 Hz, 3H, H-10), 1.91 (ddd, ²*J*= 13.1 Hz, ³*J*= 9.9 Hz, ³*J*= 9.9 Hz, 1H, H-4_a), 2.66 (ddd, ²*J*= 13.1 Hz, ³*J*= 8.0 Hz, ³*J*= 6.8 Hz, 1H, H-4_b), 3.10 (dd, ³*J*= 11.0 Hz, ³*J*= 9.9 Hz, 1H, H-6_a), 3.36 – 3.52 (m, 1H, H-5), 3.53 – 3.62 (m, 1H, H-6_b), 4.45 (dd, ³*J*= 9.9 Hz, ³*J*= 8.0 Hz, 1H, H-3), 5.31 (ddq, ³*J*= 10.7 Hz, ³*J*= 8.8 Hz, ⁴*J*= 1.7 Hz, 1H, H-8), 5.71 (dq, ³*J*= 10.7 Hz, ³*J*= 6.9 Hz, ³*J*= 1.1 Hz, 1H, H-9); ¹³C-NMR (75 MHz, D₂O): δ = 13.1 (C-10), 35.6 (C-4), 36.5 (C-5), 50.9 (C-6), 60.5 (C-3), 127.8 (C-9), 129.6 (C-8), 172.7 (C-2).



4.3.7 Synthese der pcPNA-Oligomere für den Einsatz im ARCUT-System

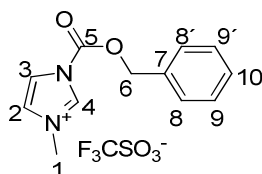
4.3.7.1 *N*-(Boc-aminoethyl)-glycinethylester (**189**)⁸⁸

N-(Boc-aminoethyl)glycinethylester (**189**) (11.20 g, 76%) wurde ausgehend von Ethylendiamin (**187a**) über zwei Stufen synthetisiert; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.28 (t, ³*J*= 7.2 Hz, 3H, H-11), 1.44 (s, 9H, H-1, H-1', H-1''), 1.65 (br s, H-7), 2.75 (t, ³*J*= 5.7 Hz, H-6), 3.17 – 3.24 (m, 2H, H-5), 3.40 (s, 2H, H-8), 4.19 (q, ³*J*= 7.2 Hz, 2H, H-10), 5.04 (br s, 1H, H-4).

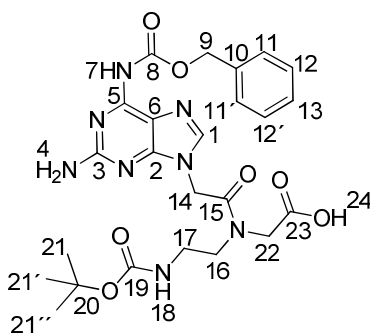


4.3.7.2 *N*-Benzyloxycarbonyl-methylimidazolium Triflat (**192**)⁸⁸

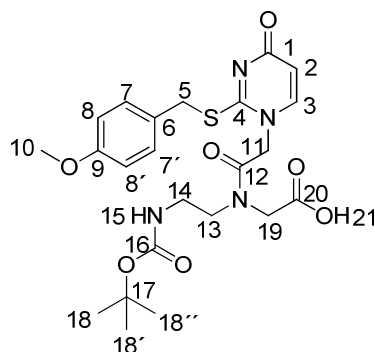
Das Rapoport-Reagenz **192** (20.2 g, 66%) wurde ausgehend von Imidazol (**190**) über zwei Stufen synthetisiert; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.91 (s, 3H, H-1), 5.56 (s, 2H, H-6), 7.40 – 7.48 (m, 3H, H-9, H-9', H-10), 7.55 (dd, ³*J*= 7.5 Hz, ⁴*J*= 1.7 Hz, 2H, H-8, H-8'), 7.86 (s, 1H, H-3), 8.19 (s, 1H, H-2), 9.89 (s, 1H, H-4).



Das Diaminopurin-Monomer **115b** (0.80 g, 6%) wurde ausgehend von 2,6-Diaminopurin (**53**) über fünf lineare Stufen entsprechend der Literatur synthetisiert; ¹H-NMR (400 MHz; DMSO-d₆): δ = 1.37 und 1.38 (s (min/maj), 9H, H-21, H-21', H-21''), 3.03 und 3.25 (m (min/maj), 2H, H-17), 3.49 (t (maj), das min-Signal überlappt mit dem H₂O-Signal, ³J = 6.3 Hz, 2H, H-16), 3.99 und 4.30 (s (maj/min), 2H, H-14), 4.89 und 5.06 (s (min/maj), 2H, H-22), 5.17 (s, 2H, H-9), 6.33 (br s, 2H, H-4), 6.77 und 7.01 (br t (min/maj), 1H, H-18), 7.33 – 7.45 (m, 5H, H-11, H-11', H-12, H-12', H-13), 7.78 und 7.79 (s (min/maj), 1H, H-1), 10.10 (br s, 1H, H-7), 12.73 (br s, 1H, H-24).



Das Thiouracil-Monomer **118b** (0.88 g, 17 %) wurde ausgehend von 2-Thiouracil (**55**) über fünf lineare Stufen entsprechend der Literatur synthetisiert; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ= 1.33 und 1.36 (s (maj/min), 9H, H-18, H-18', H-18''), 3.01 und 3.16 (q (min/maj), ³J= 6.5 Hz, 2H, H-14), 3.31 und 3.37 (t (min/maj), ³J= 6.5 Hz, 2H, H-13), 3.72 (s, 3H, H-10), 3.98 und 4.16 (s (maj/min), 2H, H-19), 4.33 und 4.34 (s (min/maj), 2H, H-11), 4.75 und 4.96 (s (min/maj), 2H, H-5), 5.90 (t, ³J= 7.4 Hz, 1H, H-3), 6.86 und 6.87 (d, (maj/min), ³J= 8.7 Hz, 2H, H-7, H-7'), 6.73 und 6.92 (br t (min/maj), ³J= 5.3 Hz, 1H, H-15), 7.32 und 7.33 (d (min/maj), ³J= 8.7 Hz, 2H, H-8, H-8'), 7.49 und 7.46 (d (min/maj), ³J= 7.6 Hz, 1H, H-2), 12.65 (br s, 1H, H-21).



4.3.7.5 Synthese der pcPNA-Sequenzen mittels modifizierter Merrifield-Festphasensynthese^{80,88}

Die pcPNA-Oligomere **193** und **194** wurden mittels der modifizierten Merrifield-Festphasensynthese synthetisiert (Abbildung 98).



193



194

Abbildung 98: Sequenz der synthetisierten pcPNA-Stränge **193**, **194**.

Präparierung des Trägerharzes:

1. MBHA (10 mg) wurde mit DMF (2 mL) versetzt und über Nacht quellen gelassen. Das Gemisch wurde in die Apparatur zur Festphasensynthese überführt.

2. Das DMF wurde abgesaugt und das Harz wurde mit Pyridin (3 x 300 µL), einer CH₂Cl₂/ DMF-Lösung (3 x 300 µL, 1/1, v/v), einer TFA/ *m*-Kresol-Lösung (2 x 200 µL, 95/5, v/v), erneut mit einer CH₂Cl₂/ DMF-Lösung (3 x 300 µL, 1/1, v/v) und schließlich mit Pyridin (4 x 300 µL) gewaschen.

Bindung der ersten Einheit an das Harz:

3. Eine Lösung aus dem einzusetzenden, geschützten Monomer (100 µL, *c* = 0.05 M) und *N,N*- Diethylcylohexylamin DECA (*c* = 0.1 M) in Pyridin wurde mit einer 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphat (HBTU)-Lösung (100 µL, *c* = 0.045 M) in DMF versetzt und 1 min bei r.t. inkubiert. Eine Pyridin/ DMF-Lösung (300 µL, 1/1, v/v) wurde zugegeben.

4. Die erhaltene Lösung (200 μL) wurde auf das Trägerharz gegeben und bei r.t. für 2 h inkubiert. Der Überschuss der Lösung wurde abgesaugt, der Rückstand wurde mit einer CH_2Cl_2 / DMF-Lösung (2 x 300 μL , 1/1, v/v) gewaschen.

5. Zu dem Gemisch wurde eine Lösung aus Essigsäureanhydrid und DMF (500 μL , 1/9, v/v) gegeben. Nach 30 min Inkubation bei r.t. wurde die überstehende Lösung abgesaugt und der Rückstand wurde mit einer CH_2Cl_2 / DMF-Lösung (2 x 300 μL , 1/1, v/v), Pyridin (3 x 300 μL), und zuletzt mit einer CH_2Cl_2 / DMF-Lösung (2 x 300 μL , 1/1, v/v) gewaschen.

6. Schritt 5 wurde wiederholt.

Verlängerung des Strangs um eine Monomereinheit:

7. Der aus Schritt 6 erhaltene Feststoff wurde mit einer CH_2Cl_2 / DMF-Lösung (2 x 300 μL , 1/1, v/v) gewaschen.

8. Der Rückstand wurde mit einer TFA/ *m*-Kresol-Lösung (150 μL , 95/5, v/v) versetzt und 4 min bei r.t. inkubiert.

9. Schritt 8 wurde vier Mal wiederholt.

10. Das aus Schritt 9 erhaltene Reaktionsgemisch wurde mit einer CH_2Cl_2 / DMF-Lösung (3 x 300 μL , 1/1) und anschließend mit Pyridin (4 x 300 μL) gewaschen.

11. Eine Lösung des einzusetzenden Monomers (100 μL , $c = 0.05 \text{ M}$) und DECA ($c = 0.1 \text{ M}$) in Pyridin wurde mit einer Lösung von HBTU (100 μL , $c = 0.045 \text{ M}$) in DMF versetzt und 1 min bei r.t. ruhen gelassen.

12. Die Lösung aus Schritt 11 (200 μL) wurde zu dem Rückstand von Schritt 10 gegeben und 20 min bei r.t. inkubiert. Die Inkubationszeit bei diesem Schritt wurde alle 5 Monomere erhöht, d.h. ab einer Kettenlänge von 5 Monomeren wurde für 25 min inkubiert, ab 10 Monomereinheiten wurde für 30 min inkubiert und so fort. Anschließend wurde die Lösung abgesaugt, und der Rückstand wurde mit Pyridin (4 x 300 μL) gewaschen.

13. Zu dem Rückstand aus Schritt 12 wurde eine Lösung aus dem Rapoport-Reagenz (**192**) (100 μL , 10%ig, *wt/wt*) in DMF gegeben. Nach 5 min wurde die überstehende Lösung abgesaugt und der Rückstand mit Pyridin (3 x 300 μL) und einer CH_2Cl_2 / DMF-Lösung (3 x 300 μL) gewaschen.

14. Der Feststoff wurde mit einer TFA/ *m*-Kresol-Lösung (150 μ L, 95/5, v/v) versetzt und für 2 min bei r.t. inkubiert.

15. Schritt 14 wurde zwei Mal durchgeführt.

Einführung der Phosphoserin-Einheit an die Sequenz:

16. Die harzgebundenen pcPNA-Stränge wurden mit *N*-Methyl-2-pyrrolidinon (NMP) (4 x 300 μ L) gewaschen.

17. Eine Lösung aus *N*- α -Fmoc-O-benzyl-L-phosphoserin (**113**) (50 μ L, *c* = 0.2 M) in NMP wurde mit einer Lösung aus DIEA (50 μ L, *c* = 0.4 M) in NMP, einer Lösung aus HOBt (50 μ L, *c* = 0.2 M) in NMP und einer Lösung aus HBTU (50 μ L, *c* = 0.18 M) in NMP versetzt und bei r.t. für 1 min inkubiert.

18. Die Lösung aus Schritt 17 (200 μ L) wurde zu dem Rückstand aus Schritt 16 gegeben und 30 min bei r.t. ruhen gelassen. Anschließend wurde die überstehende Lösung abgesaugt, und der Feststoff wurde mit NMP (4 x 300 μ L) gewaschen.

19. Zu dem Rückstand wurde eine Piperidin/ NMP-Lösung (500 μ L, 1/4, v/v) gegeben und das Gemisch wurde 1 min bei r.t. inkubiert.

20. Nach dem Absaugen der wässrigen Phase wurde Schritt 19 mit 15 min Inkubationszeit wiederholt. Der Rückstand wurde mit NMP (4 x 300 μ L) gewaschen.

Ablösen der Oligomere vom Trägerharz:

21. Der Rückstand aus Schritt 20 wurde mit einer CH₂Cl₂/ DMF-Lösung (3 x 300 μ L, 1/1, v/v) und einer TFA/ *m*-Kresol-Lösung (2 x 300 μ L, 95/5, v/v) gewaschen.

22. Eine TFA/ *m*-Kresol/ Dimethylsulfid-Lösung (1 mL, 2/2/6, v/v/v) und eine TFA/Trifluormethansulfonsäure (TFMS)-Lösung (1 mL, 9/1, v/v) wurden bei 0 °C vereint. Die erhaltene Lösung (400 μ L) wurde zu dem Feststoff von Schritt 21 gegeben und für 1 h bei r.t. inkubiert. Die überstehende Lösung wurde abgesaugt, und der Rückstand wurde mit TFA (2 x 300 μ L) gewaschen.

23. Der Feststoff aus Schritt 22 wurde in ein 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit einer eisgekühlten TFMS/ TFA/ *m*-Kresol-Lösung (400 μ L, 1/8/1, v/v/v) versetzt und 1 h bei r.t. geschüttelt.

24. Von dem verbliebenen Feststoff wurde abfiltriert, der Rückstand wurde mit TFA (2 x 200 μ L) gewaschen.

25. Zu der erhaltenen Lösung wurde Et₂O (1.5 mL) gegeben, und das Gemisch wurde 15 min bei 14000 U/min zentrifugiert. Die flüssige Phase wurde abdekantiert.

26. Schritt 25 wurde wiederholt.

27. Der zurückgebliebene Feststoff wurde in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

Analyse des Rückstands mittels LC-MS und Aufreinigung mittels HPLC

Die getrocknete Substanz aus Schritt 27 wurde in Wasser gelöst (500 μ L), über einen Mikrofilter von Feststoffpartikeln befreit und mittels LC-HRMS analysiert. Der entsprechende Peak wurde anschließend mittels HPLC isoliert. Sowohl für die LC-HRMS-Analyse, als auch für die HPLC-Aufreinigung wurde ein Gradientensystem verwendet (Tabelle 5).

Tabelle 5: Gradientensystem für die LC-HRMS-Analyse und HPLC-Aufreinigung der pcPNA-Oligomere **193**, **194**.

| t [min] | H ₂ O + 0.1 Vol% TFA [%] | ACN + 0.1 Vol% TFA [%] |
|------------|---|---------------------------|
| 0 | 100 | 0 |
| 25 | 75 | 25 |
| 30 | 75 | 25 |

Für den pcPNA₁-Strang **193** wurde folgende Masse detektiert:

$M_{194} = 4634.6$ g/mol, berechnet: $M_{194, \text{kalk.}} = 4634.7$ g/mol

Für den pcPNA₂-Strang **194** wurde folgende Masse detektiert:

$M_{195} = 4842.9$ g/mol, berechnet: $M_{195, \text{kalk.}} = 4842.9$ g/mol

5 Literaturverzeichnis

1. Von Nussbaum, F., Brands, M., Hinzen, B., Weigand, S. & Häbich, D.: Antibakterielle Naturstoffe in der medizinischen Chemie – Exodus oder Renaissance? *Angew. Chem.* **2006**, 118, 5194–5254.
2. Spellberg, B., Powers, J. H., Brass, E. P., Miller, L. G. & Edwards, J. E.: Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. *Clin. Infect. Dis.* **2004**, 38, 1279–1286.
3. Fischbach, M. & Walsh, C. T.: Antibiotics for emerging pathogens. *Science* **2009**, 325, 1089–1093.
4. Leeb, M.: Antibiotics: a shot in the arm. *Nature* **2004**, 431, 899–893.
5. Weigel, L. M. *et al.*: Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science* **2003**, 302, 1569–1571.
6. World Health Organization (WHO) Geneva: Overcoming antimicrobial resistance, **2000**.
7. Newman, D. J., Cragg, G. M. & Snader, K. M.: Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 1022–1037.
8. Demain, A. L. & Sanchez, S.: Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J. Antibiot.* **2009**, 62, 5–16.
9. Dewick, P. M.: *Medicinal natural products*, John Wiley & Sons, Chichester, **2009**.
10. Piel, J.: Biosynthesis of polyketides by trans-AT polyketide synthases. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, 27, 996–1047.
11. Hertweck, C.: The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 4688–4716.
12. Moldenhauer, J.: Biosynthetische Studien von trans-AT- Polyketidsynthasen. *Dissertation* **2009**, Universität Bonn.
13. Hopwood, D. A.: Cracking the polyketide code. *PLOS Biol.* **2004**, 2, 166–169.
14. Niederkrüger, H.: Expressionssysteme zur Untersuchung der Pederin- und Psymberin-Biosynthese aus nicht kultivierten bakteriellen Symbionten. *Dissertation* **2010**, Universität Bonn.
15. Sattely, E. S., Fischbach, M. a & Walsh, C. T.: Total biosynthesis: *in vitro* reconstitution of polyketide and nonribosomal peptide pathways. *Nat. Prod. Rep.* **2008**, 25, 757–793.
16. Lai, J. R., Koglin, A. & Walsh, C. T.: Carrier protein structure and recognition in polyketide and nonribosomal peptide. *Biochemistry* **2006**, 45, 14869–14879.
17. Du, L. & Lou, L.: PKS and NRPS release mechanisms. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, 27, 255–278.
18. Rix, U., Fischer, C., Remsing, L. L. & Rohr, J.: Modification of post-PKS tailoring steps through combinatorial biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* **2002**, 19, 542–580.

19. Staunton, J. & Weissman, K. J.: Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, 18, 380–416.
20. Hendrickson, L. *et al.*: Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*: characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene. *Chem. Biol.* **1999**, 6, 429–439.
21. Weissman, K. J.: Introduction to polyketide biosynthesis in *Methods in Enzymology*, Academic Press, Waltham, **2009**, 459, 3–16.
22. Rawlings, B. J.: Type I polyketide biosynthesis in bacteria (part A - erythromycin biosynthesis). *Nat. Prod. Rep.* **2001**, 18, 190–227.
23. Khosla, C., Tang, Y., Chen, A. Y., Schnarr, N. A. & Cane, D. E.: Structure and mechanism of the 6-deoxyerythronolide B synthase. *Annu. Rev. Biochem.* **2007**, 76, 195–221.
24. Cheng, Y.-Q., Tang, G.-L. & Shen, B.: Type I polyketide synthase requiring a discrete acyltransferase for polyketide biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, 100, 3149–3154.
25. Piel, J.: A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus* beetles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, 99, 14002–14007.
26. Nguyen, T. *et al.*: Exploiting the mosaic structure of trans-acyltransferase polyketide synthases for natural product discovery and pathway dissection. *Nat. Biotechnol.* **2008**, 26, 225–233.
27. Piel, J., Hui, D., Fusetani, N. & Matsunaga, S.: Targeting modular polyketide synthases with iteratively acting acyltransferases from metagenomes of uncultured bacterial consortia. *Environ. Microbiol.* **2004**, 6, 921–927.
28. Scotti, C. *et al.*: A *Bacillus subtilis* large ORF coding for a polypeptide highly similar to polyketide synthases. *Gene* **1993**, 130, 65–71.
29. Chen, X.-H. *et al.*: Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42. *J. Bacteriol.* **2006**, 188, 4024–4036.
30. Butcher, R. a *et al.*: The identification of bacillaene, the product of the PksX megacomplex in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, 104, 1506–15099.
31. Uria, A. R.: Investigating natural product biosynthesis in uncultivated symbiotic bacteria of the marine sponge *Theonella swinhoei*. *Dissertation* **2012**, Universität Bonn.
32. Sandmann, A. *et al.*: A Type II polyketide synthase from the gram-negative bacterium *Stigmatella aurantiaca* is involved in aurachin alkaloid biosynthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 2712–2716.
33. Brachmann, A. O. *et al.*: A type II polyketide synthase is responsible for anthraquinone biosynthesis in *Photorhabdus luminescens*. *ChemBioChem* **2007**, 8, 1721–1728.
34. Rawlings, B. J.: Biosynthesis of polyketides (other than actinomycete macrolides). *Nat. Prod. Rep.* **1999**, 16, 425–484.
35. Moore, B. S. & Hopke, J. N.: Discovery of a new bacterial polyketide biosynthetic pathway. *ChemBioChem* **2001**, 2, 35–38.

36. Seshime, Y., Juvvadi, P. R., Fujii, I. & Kitamoto, K.: Discovery of a novel superfamily of type III polyketide synthases in *Aspergillus oryzae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 331, 253–260.
37. Austin, M. B. & Noel, J. P.: The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, 20, 79–110.
38. Song, L. *et al.*: Type III polyketide synthase β -ketoacyl-ACP starter unit and ethylmalonyl-CoA extender unit selectivity discovered by *Streptomyces coelicolor* genome mining. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 14754–14755.
39. Hur, G. H., Vickery, C. R. & Burkart, M. D.: Explorations of catalytic domains in non-ribosomal peptide synthetase enzymology. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, 29, 1074–1098.
40. Walsh, C. T., O'Brien, R. V & Khosla, C.: Nonproteinogenic amino acid building blocks for nonribosomal peptide and hybrid polyketide scaffolds. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 7098–7124.
41. Schwarzer, D., Finking, R. & Marahiel, M. A.: Nonribosomal peptides: from genes to products. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, 20, 275–287.
42. Sieber, S. A. & Marahiel, M. A.: Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: approaches to new antibiotics. *Chem. Rev.* **2005**, 105, 715–738.
43. Fischbach, M. a & Walsh, C. T.: Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms. *Chem. Rev.* **2006**, 106, 3468–3496.
44. Finking, R. & Marahiel, M. a: Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annu. Rev. Microbiol.* **2004**, 58, 453–488.
45. Omura, S. *et al.*: Takaokamycin, a new peptide antibiotic produced by *Streptomyces sp.* *J. Antibiot.* **1984**, 37, 700–705.
46. Andres, N. *et al.*: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 253. Mitteilung. Hormaomycin, ein neues Peptid-lacton mit morphogener Aktivität auf Streptomyceten. *Helv. Chim. Acta* **1989**, 72, 426–437.
47. Rössner, E., Zeeck, A. & König, W. A.: Elucidation of the structure of hormaomycin. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1990**, 29, 64–65.
48. Zlatopolskiy, B. D. *et al.*: Final elucidation of the absolute configuration of the signal metabolite hormaomycin. *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 4708–4717.
49. Otoguro, K. *et al.*: *In vitro* antimalarial activities of the microbial metabolites. *J. Antibiot.* **2003**, 56, 322–324.
50. Zlatopolskiy, B. D., Radzom, M., Zeeck, A. & de Meijere, A.: Synthesis and precursor-directed biosynthesis of new hormaomycin analogues. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 1525–1534.
51. Höfer, I. *et al.*: Insights into the biosynthesis of hormaomycin, an exceptionally complex bacterial signaling metabolite. *Chem. Biol.* **2011**, 18, 381–391.
52. Radzom, M.: Beiträge zur Biosynthese der antiparasitären Naturstoffe Hormaomycin und Borrelidin sowie Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten aus Actinomyceten. *Dissertation* **2006**, Universität Göttingen.

53. Crüsemann, M.: Studien zur Biosynthese des Hormaomycins. *Dissertation* **2012**, Universität Bonn.
54. Cane, D. E. & Walsh, C. T.: The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* **1999**, *6*, R319–R325.
55. Tanaka, H. *et al.*: Structure of FK506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces*. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5031–5033.
56. Du, L., Sánchez, C., Chen, M., Edwards, D. J. & Shen, B.: The biosynthetic gene cluster for the antitumor drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 supporting functional interactions between nonribosomal peptide synthetases and a polyketide synthase. *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 623–642.
57. Patel, P. S. *et al.*: Bacillaen, a novel inhibitor of procaryotic protein synthesis produced by *Bacillus subtilis*: production, taxonomy, isolation, physico-chemical characterization and biological activity. *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 997–1003.
58. Schroeder, F. C. *et al.*: Differential analysis of 2D NMR spectra: new natural products from a pilot-scale fungal extract library. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 901–904.
59. Albertini, A. M., Caramori, T., Scoffone, F., Scotti, C. & Galizzi, A.: Sequence around the 159° region of the *Bacillus subtilis* genome: the *pksX* locus spans 33.6 kb. *Microbiology* **1995**, *141*, 299–309.
60. Kunst, F. *et al.*: The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **1997**, *390*, 249–256.
61. Straight, P. D., Fischbach, M. a, Walsh, C. T., Rudner, D. Z. & Kolter, R.: A singular enzymatic megacomplex from *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 305–310.
62. Moldenhauer, J., Chen, X.-H., Borriss, R. & Piel, J.: Biosynthesis of the antibiotic bacillaene, the product of a giant polyketide synthase complex of the trans-AT family. *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 8343–8345.
63. Moldenhauer, J. *et al.*: The final steps of bacillaene biosynthesis in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42: direct evidence for β,γ -dehydration by a trans-acyltransferase polyketide synthase. *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 1507–1509.
64. Calderone, C. T., Bumpus, S. B., Kelleher, N. L., Walsh, C. T. & Magarvey, N. A.: A ketoreductase domain in the PksJ protein of the bacillaene assembly line carries out both α - and β -ketone reduction during chain growth. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 12809–12814.
65. Calderone, C. T., Kowtoniuk, W. E., Kelleher, N. L., Walsh, C. T. & Dorrestein, P. C.: Convergence of isoprene and polyketide biosynthetic machinery: isoprenyl-S-carrier proteins in the *pksX* pathway of *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 8977–8982.
66. Calderone, C. T.: Isoprenoid-like alkylations in polyketide biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 845–853.
67. Dorrestein, P. C. *et al.*: Activity screening of carrier domains within nonribosomal peptide synthetases using complex substrate mixtures and large molecule mass spectrometry. *Biochemistry* **2006**, *45*, 1537–1546.

-
68. Cichewicz, R. H., Valeriote, F. A. & Crews, P.: Psymberin, a potent sponge-derived cytotoxin from *Psammocinia* distantly related to the pederin family. *Org. Lett.* **2004**, 6, 1951–1954.
69. Pettit, G. R. *et al.*: Antineoplastic Agents. 520. Isolation and structure of irciniastatins A and B from the indo-pacific marine sponge *Ircinia ramosa*. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 1149–1152.
70. Jiang, X., Williams, N. & De Brabander, J. K.: Synthesis of psymberin analogues: probing a functional correlation with the pederin/mycalamide family of natural products. *Org. Lett.* **2007**, 9, 227–230.
71. Jiang, X., García-Fortanet, J. & De Brabander, J. K.: Synthesis and complete stereochemical assignment of psymberin/irciniastatin A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 11254–11255.
72. Fisch, K. M. *et al.*: Polyketide assembly lines of uncultivated sponge symbionts from structure-based gene targeting. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, 5, 494–501.
73. Dehn, R. *et al.*: Molekulare Grundlage für die Biosynthese von Elansolid: Beweise für eine einzigartige, durch ein Chinonmethid initiierte intramolekulare Diels-Alder-Cycloaddition/Makrolactonisierung. *Angew. Chem.* **2011**, 123, 3968–3973.
74. Less, S. L., Handa, S., Leadlay, P. F., Dutton, C. J. & Staunton, J.: Biosynthesis of tetronasin: Part 5. Novel fluorinated and non-fluorinated analogues of tetronasin via intact incorporation of di-, tri- and tetraketide analogue precursors. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 3511–3514.
75. Less, S. L. *et al.*: Biosynthesis of tetronasin: Part 6. Preparation of structural analogues of the diketide and triketide biosynthetic precursors to tetronasin. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 3515–3518.
76. Less, S. L., Leadlay, P. F., Dutton, C. J. & Staunton, J.: Biosynthesis of tetronasin: Part 7. Preparation of structural analogues of the tetraketide biosynthetic precursor to tetronasin. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 3519–3520.
77. Taft, F., Knobloch, T., Floss, H. G., Kirschning, A. & Brünjes, M.: Timing of the $\Delta^{10,12}$ - $\Delta^{11,13}$ double bond migration during ansamitocin biosynthesis in *Actinosynnema pretiosum*. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 3812–3813.
78. Pfeifer, B. A. & Khosla, C.: Biosynthesis of polyketides in heterologous hosts. *Microbiol. Mol. Biol. R.* **2001**, 65, 106–118.
79. Peiru, S., Menzella, H. G., Rodrı, E., Carney, J. & Gramajo, H.: Production of the potent antibacterial polyketide erythromycin C in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, 71, 2539–2547.
80. Komiyama, M., Aiba, Y., Yamamoto, Y. & Sumaoka, J.: Artificial restriction DNA cutter for site-selective scission of double-stranded DNA with tunable scission site and specificity. *Nat. Protoc.* **2008**, 3, 655–662.
81. Katada, H. & Komiyama, M.: Artificial restriction DNA cutters as new tools for gene manipulation. *ChemBioChem* **2009**, 10, 1279–1288.
82. Ito, K., Katada, H., Shigi, N. & Komiyama, M.: Site-selective scission of human genome by artificial restriction DNA cutter. *Chem. Commun.* **2009**, 6542–6544.

83. Katada, H., Chen, H. J., Shigi, N. & Komiyama, M.: Homologous recombination in human cells using artificial restriction DNA cutter. *Chem. Commun.* **2009**, 6545–6547.
84. Nielsen, P. E., Egholm, M., Berg, R. H. & Buchardt, O.: Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* **1991**, 254, 1497–1500.
85. Egholm, M., Buchardt, O., Nielsen, P. E. & Berg, R. H.: Peptide nucleic acids (PNA). Oligonucleotide analogs with an achiral peptide backbone. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 1895–1897.
86. Lohse, J., Dahl, O. & Nielsen, P. E.: Double duplex invasion by peptide nucleic acid: a general principle for sequence-specific targeting of double-stranded DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, 96, 11804–11808.
87. Haaima, G., Hansen, H. F., Christensen, L., Dahl, O. & Nielsen, P. E.: Increased DNA binding and sequence discrimination of PNA oligomers containing 2,6-diaminopurine. *Nucleic acids research* **1997**, 25, 4639–4643.
88. Komiyama, M., Aiba, Y., Ishizuka, T. & Sumaoka, J.: Solid-phase synthesis of pseudo-complementary peptide nucleic acids. *Nat. Protoc.* **2008**, 3, 646–654.
89. Gulder, T. M., Freeman, M. & Piel, J.: The catalytic diversity of multimodular polyketide synthases: natural product biosynthesis beyond textbook assembly rules in *Topics in current chemistry*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **2011**, 1–53.
90. Brimble, M. A. & Furkert, D. P.: Synthesis of the 1,6,8-trioxadispiro[4.1.5.2]tetradec-11-ene ring system present in the spirolide family of shellfish toxins and its conversion into a 1,6,8-tridioxadispiro[4.1.5.2]-tetradec-9-en-12-ol via base-induced rearrangement of an epoxide. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 3573–3583.
91. Mortensen, M. S., Osbourn, J. M. & O'Doherty, G. A.: De novo formal synthesis of (–)-virginiamycin M2 via the asymmetric hydration of dienoates. *Org. Lett.* **2007**, 9, 3105–3108.
92. Zlatopolskiy, B. D., Kroll, H.-P., Melotto, E. & DeMeijere, A.: Convergent syntheses of *N*-Boc-protected (2*S*,4*R*)-4-(*Z*)-propenylproline and 5-chloro-1-(methoxymethoxy)pyrrol-2-carboxylic acid - two essential building blocks for the signal metabolite hormaomycin. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 4492–4502.
93. Waldo, G. S., Standish, B. M., Berendzen, J. & Terwilliger, T. C.: Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* **1999**, 17, 691–695.
94. Jenner, M. *et al.*: Substrate specificity in ketosynthase domains from trans-AT polyketide synthases. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 1143–1147.
95. Vergnolle, O., Hahn, F., Baerga-Ortiz, A., Leadlay, P. F. & Andexer, J. N.: Stereoselectivity of isolated dehydratase domains of the borrelidin polyketide synthase: implications for *cis*-double bond formation. *ChemBioChem* **2011**, 12, 1011–1014.
96. Zhang, X. *et al.*: A class of Trp-Trp-AA-OBzl: Synthesis, *in vitro* anti-proliferation/ *in vivo* anti-tumor evaluation, intercalation-mechanism investigation and 3D QSAR analysis. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 3410–3419.
97. Fu, S., Fu, X., Zhang, S., Zou, X. & Wu, X.: Highly diastereo- and enantioselective direct aldol reactions by 4-*tert*-butyldimethylsiloxy-substituted organocatalysts derived from *N*-prolylsulfonamides in water. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, 20, 2390–2396.

98. Deska, J., Hähn, S. & Kazmaier, U.: Stereoselective synthesis of deuterated β -cyclohexenylserine, a biosynthetic intermediate of the salinosporamides. *Org. Lett.* **2011**, 13, 3210–3213.
99. Lahasky, S. H., Hu, X. & Zhang, D.: Thermoresponsive poly(α -peptoid)s: tuning the cloud point temperatures by composition and architecture. *ACS Macro Lett.* **2012**, 1, 580–584.
100. Dettner, F. *et al.*: Totalsynthese des antiviralen Peptidantibiotikums Feglymycin. *Angew. Chem.* **2009**, 121, 1888–1893.
101. Cohen-Arazi, N., Katzhendler, J., Kolitz, M. & Domb, A. J.: Communications to the editor preparation of new α -hydroxy acids derived from amino acids and their corresponding polyesters. *Macromolecules* **2008**, 41, 7259–7263.
102. Athanasellis, G., Detsi, A., Prousis, K., Igglessi- Markopoulou, O. & Markopoulos, J.: A novel access to 2-aminofuranones via cyclization of functionalized γ -hydroxy- α,β -butenoates derived from *N*-hydroxybenzotriazole esters of α -hydroxy Acids. *Synthesis* **2003**, 2015–2022.
103. Yadav, J. S., Yadav, N. N., Rao, T. S., Reddy, B. V. S. & Al Khazim Al Ghamdi, A.: Enantioselective total synthesis of (+)-vittatalactone. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 4603–4608.
104. Moldenhauer, J.: Synthese von Polyketidvorstufen zum Studium der Pederinbiosynthese. *Diplomarbeit* **2006**, Universität Bonn.
105. Kusebauch, B., Brendel, N., Kirchner, H., Dahse, H.-M. & Hertweck, C.: Assessing oxazole bioisosteres as mutasynthons on the rhizoxin assembly line. *ChemBioChem* **2011**, 12, 2284–2288.
106. Kohlhaas, C. *et al.*: Amino acid-accepting ketosynthase domain from a trans-AT polyketide synthase exhibits high selectivity for predicted intermediate. *Chem. Sci.* **2013**, 4, 3212–3217.
107. Smith, A. B., Chen, S. S.-Y., Nelson, F. C., Reichert, J. M. & Salvatore, B. A.: Total syntheses of (+)-acutiphycin and (+)-trans-20,21-didehydroacutiphycin. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 10935–10946.
108. Noack, M. & Göttlich, R.: Iodide-catalysed cyclization of unsaturated *N*-chloroamines : a new way to synthesise 3-chloropiperidines. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 3171–3178.
109. Johnson, W. S. *et al.*: Simple stereoselective version of the Claisen rearrangement leading to *trans*-trisubstituted olefinic bonds. Synthesis of squalene. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 741–743.
110. Lebel, H. & Jacobsen, E. N.: Enantioselective total synthesis of taurospongine A. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 9624–9625.
111. Münster, N., Harms, K. & Koert, U.: Differentiation of diastereotopic bromine atoms in S_N2 reactions of gem-dibromides. *Chem. Commun.* **2012**, 48, 1866–1867.
112. Brückner, R. *et al.*: Praktikum Präparative Organische Chemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2008**, 296.
113. Page, P. C., Chan, Y., Heaney, H., McGrath, M. J. & Moreno, E.: The efficient synthesis of alkoxy-esters from hydroxy carboxylic acids using dimethylsulfide followed by alkylation with an alkyl halide. *Synlett* **2004**, 2606–2608.

114. Radha Krishna, P. & Srinivas, P.: PTSA-catalyzed tandem cyclization protocol for the stereoselective total synthesis of obolactone. *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51, 2295–2296.
115. Grünschow, S., Buchholz, T. J., Seufert, W., Dordick, J. S. & Sherman, D. H.: Substrate profile analysis and ACP-mediated acyl transfer in *Streptomyces coelicolor* Type III polyketide synthases. *ChemBioChem* **2007**, 8, 863–838.
116. Still, W. C. & Gennari, C.: Direct synthesis of Z-unsaturated esters. A useful modification of the horner-emmons olefination. *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24, 4405–4408.
117. Brückner, R.: Reaktionsmechanismen. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2007**, 455–483.
118. Caron, P.-Y. & Deslongchamps, P.: Versatile strategy to access tricycles related to quassinoids and triterpenes. *Org. Lett.* **2010**, 12, 508–511.
119. Maryanoff, B. E., Reitz, A. B., Mutter, M. S., Whittle, R. R. & Olofson, R. A.: Stereochemistry and mechanism of the Wittig reaction. Diastomeric reaction intermediates and analysis of the reaction course. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 7664–7678.
120. Schlosser, M. & Christmann, K. F.: Olefinierungen mit Phosphor-Yliden, I. Mechanismus und Stereochemie der Wittig-Reaktion. *Liebigs Ann. Chem.* **1967**, 708, 1–35.
121. Krivickas, S. J., Tamanini, E., Todd, M. H. & Watkinson, M.: Effective methods for the biotinylation of azamacrocycles. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 8280–8289.
122. Menche, D., Hassfeld, J., Li, J., Mayer, K. & Rudolph, S.: Modular total synthesis of archazolid A and B. *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 7220–7229.
123. Delcros, J.-G. *et al.*: Effect of spermine conjugation on the cytotoxicity and cellular transport of acridine. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 5098–5111.
124. Chen, X. *et al.*: New method for the synthesis of sulforaphane and related isothiocyanates. *Synthesis* **2011**, 24, 3991–3996.
125. Xiao, X., Antony, S., Kohlhagen, G., Pommier, Y. & Cushman, M.: Design, synthesis, and biological evaluation of cytotoxic 11-aminoalkenylindenoisoquinoline and 11-diaminoalkenylindenoisoquinoline topoisomerase I inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 5147–5160.
126. Coste, J., Le-Nguyen, D. & Castro, B.: PyBOP®: A new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product. *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 205–208.
127. Høeg-Jensen, T., Jakobsen, M. H. & Holm, A.: A new method for rapid solution synthesis of shorter peptides by use of PyBOP®. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 6387–6390.
128. Valeur, E. & Bradley, M.: Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 606–631.
129. Feldman, K. S., Saunders, J. C. & Wroblewski, M. L.: Alkynylodonium salts in organic synthesis. Development of a unified strategy for the syntheses of (–)-agelastatin A and (–)-agelastatin B. *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, 67, 7096–7109.
130. Klahn, P., Duschek, A., Liébert, C. & Kirsch, S. F.: Total synthesis of (+)-cyperolone. *Org. Lett.* **2012**, 14, 1250–1253.

131. Kretschmer, M. & Menche, D.: Stereocontrolled synthesis of the C8-C22 fragment of rhizopodin. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 382–385.
132. Kwong Kar-Wing, C., Fu Yunyi, M., Law Chun-Hin, H. & Toy H., P.: Isomerization of electron-poor alkynes to the corresponding (*E,E*)-1,3-dienes using a bifunctional polymeric catalyst bearing triphenylphosphine and phenol groups. *Synlett* **2010**, *2010*, 2617–2620.
133. Kocienski, P. J.: Protecting groups. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2005**.
134. Acharya, H. P., Miyoshi, K. & Kobayashi, Y.: Mercury-free preparation and selective reactions of propargyl (and propargylic) grignard reagents. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3535–3538.
135. Marshall, J. A.: Synthesis and reactions of allylic, allenic, vinylic, and arylmetal reagents from halides and esters via transient organopalladium intermediates. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 3163–3186.
136. Klee, N. *et al.*: Selective delivery of 2-hydroxy APA to *Trypanosoma brucei* using the melamine motif. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4364–4366.
137. Trost, B. M. & Fandrick, D. R.: DYKAT of vinyl aziridines: total synthesis of (+)-pseudodistomin D. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 823–826.
138. Shpasser, D. *et al.*: A paradigm for solvent and temperature induced conformational changes. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 8285–8289.
139. Xu, Z., DiCesare, J. C. & Baures, P. W.: Parallel synthesis of an oligomeric imidazole-4,5-dicarboxamide library. *J. Comb. Chem.* **2010**, *12*, 248–254.
140. Narita, K. *et al.*: Total synthesis of the bicyclic depsipeptide HDAC inhibitors spiruchostatins A and B, 5''-epi-spiruchostatin B, FK228 (FR901228) and preliminary evaluation of their biological activity. *Chem. Lett.* **2009**, *15*, 11174–11186.
141. Zhang, W., Sun, T.-T. & Li, Y.-X.: Synthesis of the C-terminal penta-peptide of the peptaibol culicinins. *J. Pept. Sci.* **2009**, *15*, 366–368.
142. Medina, R. *et al.*: Structure-based design of potent and selective 3-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) inhibitors. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1871–1895.
143. Pasunooti, K. K. *et al.*: Synthesis of 4-mercapto-L-lysine derivatives: potential building blocks for sequential native chemical ligation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6268–6271.
144. Tosatti, P. *et al.*: Iridium-catalyzed asymmetric allylic amination with polar amines: access to building blocks with lead-like molecular properties. *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 3153–3157.
145. Jia, Y. *et al.*: Mechanistic studies on class I polyhydroxybutyrate (PHB) synthase from *Ralstonia eutropha*: class I and III synthases share a similar catalytic mechanism. *Biochemistry* **2001**, *40*, 1011–1019.
146. Kane, B. E., Grant, M. K. O., El-Fakahany, E. E. & Ferguson, D. M.: Synthesis and evaluation of xanomeline analogs—probing the wash-resistant phenomenon at the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 1376–1392.

-
147. Dave, R. & Sasaki, N. A.: Facile route to 3,5-disubstituted morpholines: enantioselective synthesis of *O*-protected *trans*-3,5-bis(hydroxymethyl)morpholines. *Org. Lett.* **2004**, 6, 15–18.
148. Zhong, F., Luo, J., Chen, G.-Y., Dou, X. & Lu, Y.: Highly enantioselective regiodivergent allylic alkylations of MBH carbonates with phthalides. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 10222–10227.
149. Ireland, R. E., Gleason, J. L., Gegnas, L. D. & Highsmith, T. K.: A total synthesis of FK-5061. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 6856–6872.
150. Zacuto, M. J. & Leighton, J. L.: Divergent synthesis of complex polyketide-like macrolides from a simple polyol fragment. *Org. Lett.* **2005**, 7, 5525–5527.
151. Français, A., Leyva-Pérez, A., Etxebarria-Jardi, G., Peña, J. & Ley, S. V.: Total synthesis of iso- and bongkreic acids: natural antibiotics displaying potent antiapoptotic properties. *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 329–343.
152. Jensen, T., Pedersen, H., Bang-Andersen, B., Madsen, R. & Jørgensen, M.: Palladium-catalyzed aryl amination–Heck cyclization cascade: a one-flask approach to 3-substituted indoles. *Angew. Chem.* **2008**, 120, 902–904.
153. Girard, A.-L., Lhermet, R., Fressigné, C., Durandetti, M. & Maddaluno, J.: Influence of the acetylenic substituent on the intramolecular carbolithiation of alkynes. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 2895–2905.
154. Shin, D., Rew, Y. & Boger, D. L.: Total synthesis and structure of the ramoplanin A1 and A3 aglycons: two minor components of the ramoplanin complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, 101, 11977–11979.
155. Qin, H.-L. & Panek, J. S.: Total synthesis of the Hsp90 inhibitor geldanamycin. *Org. Lett.* **2008**, 10, 2477–2479.
156. Zhengming, L., Tiansheng, W., Diankun, Z. & Zhengheng, G.: A stereoselective synthesis of pear ester via arsenic ylide. *Synth. Commun.* **1989**, 19, 91–96.
157. Brown, C. A. & Ahuja, V. K.: Catalytic hydrogenation. VI. Reaction of sodium borohydride with nickel salts in ethanol solution. P-2 Nickel, a highly convenient, new, selective hydrogenation catalyst with great sensitivity to substrate structure. *J. Org. Chem.* **1973**, 38, 2226–2230.
158. Karbaum, P.: Untersuchungen zur Radikalischen Regiodivergenten Epoxidöffnung. *Dissertation* **2011**, Universität Bonn.
159. Csaky, A. G., Herran, G. de la & Murcia, M. C.: Conjugate addition reactions of carbon nucleophiles to electron-deficient dienes. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 4080–4102.
160. Gilbert, I. H. *et al.*: Synthesis of β -keto and α,β -unsaturated N-acetylcysteamine thioesters. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, 5, 1587–1590.
161. Cai, X.: Molecular analysis of genes involved in the biosynthesis and regulation of hormaomycin, an exceptionally complex bacterial signaling metabolite. *Dissertation* **2013**, eingereicht.
162. Crüsemann, M., Kohlhaas, C. & Piel, J.: Evolution-guided engineering of nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chem. Sci.* **2013**, 4, 1041–1045.

-
163. Cai, X. *et al.*: Manipulation of regulatory genes reveals complexity and fidelity in hormaomycin biosynthesis. *Chem. Biol.* **2013**, *20*, 839–846.
164. Hünig, S., Kreitmeier, P., Märkl, G. & Sauer, J.: Arbeitsmethoden in der organischen Chemie. Verlag Lehmanns, Berlin, **2006**, 252–272.
165. Gottlieb, H. E., Kotlyar, V. & Nudelman, A.: NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512–7515.
166. Elokda, H. *et al.*: Design, synthesis, and biological evaluation of thio-containing compounds with serum HDL-cholesterol-elevating properties. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 681–695.
167. Dutta, S., Kim, S.-K., Patel, D. B., Kim, T.-J. & Chang, Y.: Some new DTPA-N,N"-bis(amides) functionalized by alkyl carboxylates: synthesis, complexation and stability properties. *Polyhedron* **2007**, *26*, 3799–3809.
168. Jefford, C. W. & Wang, Y.: A simple, general diastereoselective synthesis of 5-hydroxyalkylbutan-4-olides. *Chem. Commun.* **1987**, 1513–1514.
169. Perreault, S. & Spino, C.: Meldrum's acid-derived thione dienophile in a convergent and stereoselective synthesis of a tetracyclic quassinoid intermediate. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4385–4388.
170. Mori, S., Iwamoto, S. & Yamauchi, S.: Synthesis of a glandular secretion of the civet cat, (2*S*,6*S*)-(6-methyltetrahydropyran-2-yl)acetic acid and its enantiomer, by using the yeast-reduction product and recovered substrate from yeast reduction. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2006**, *70*, 712–717.
171. McKenna, M., Grabchev, I. & Bosch, P.: The synthesis of a novel 1,8-naphthalimide based PAMAM-type dendron and its potential for light-harvesting. *Dyes Pigm.* **2009**, *81*, 180–186.

6 Anhang

6.1 NMR-Spektren

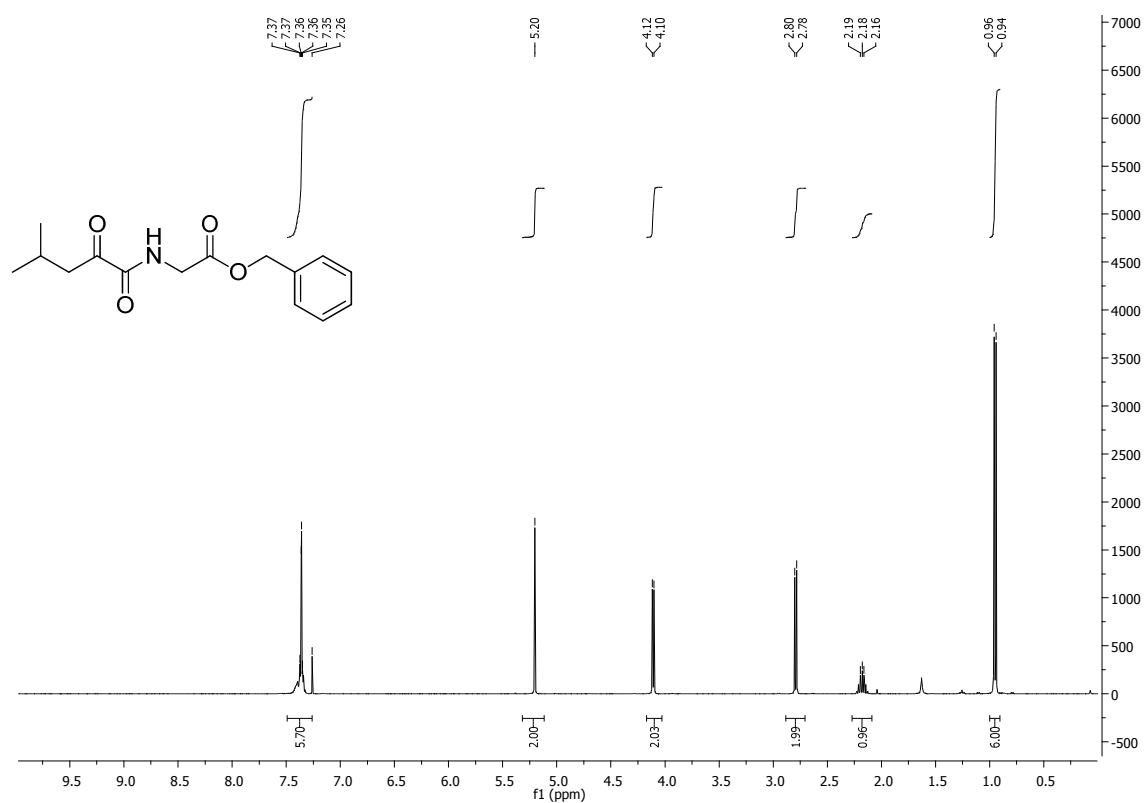
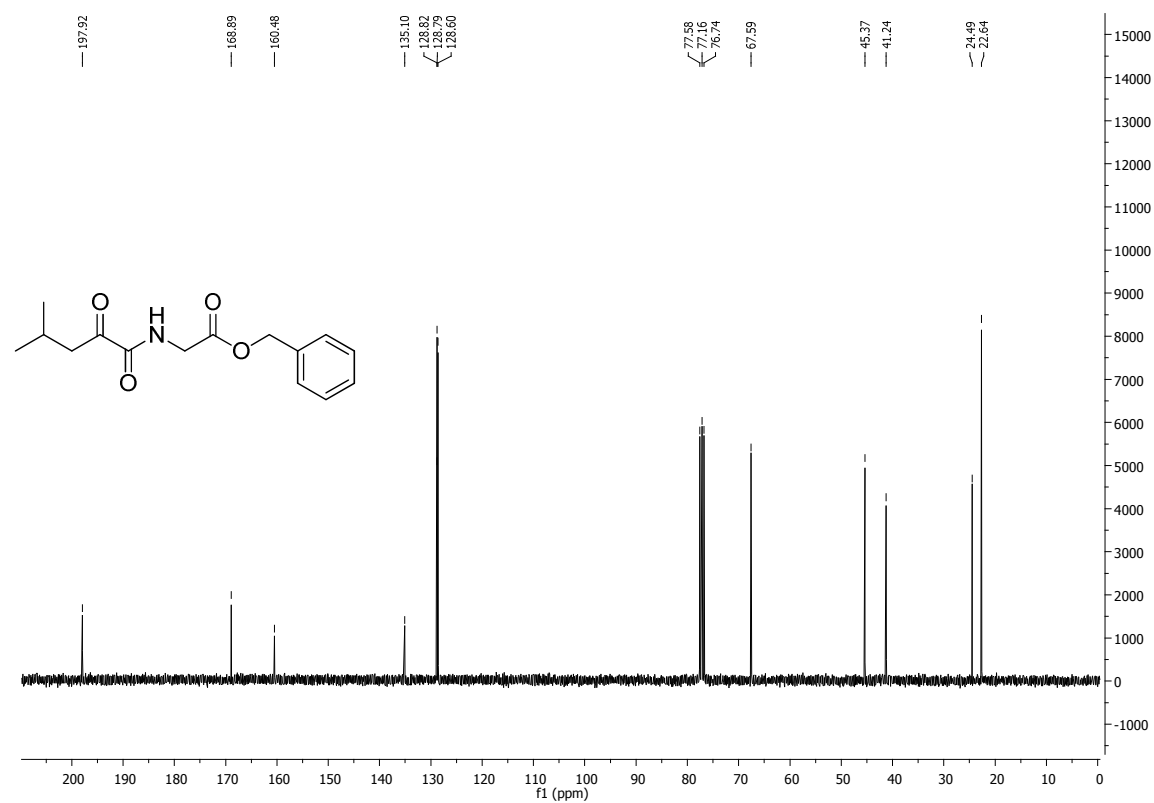
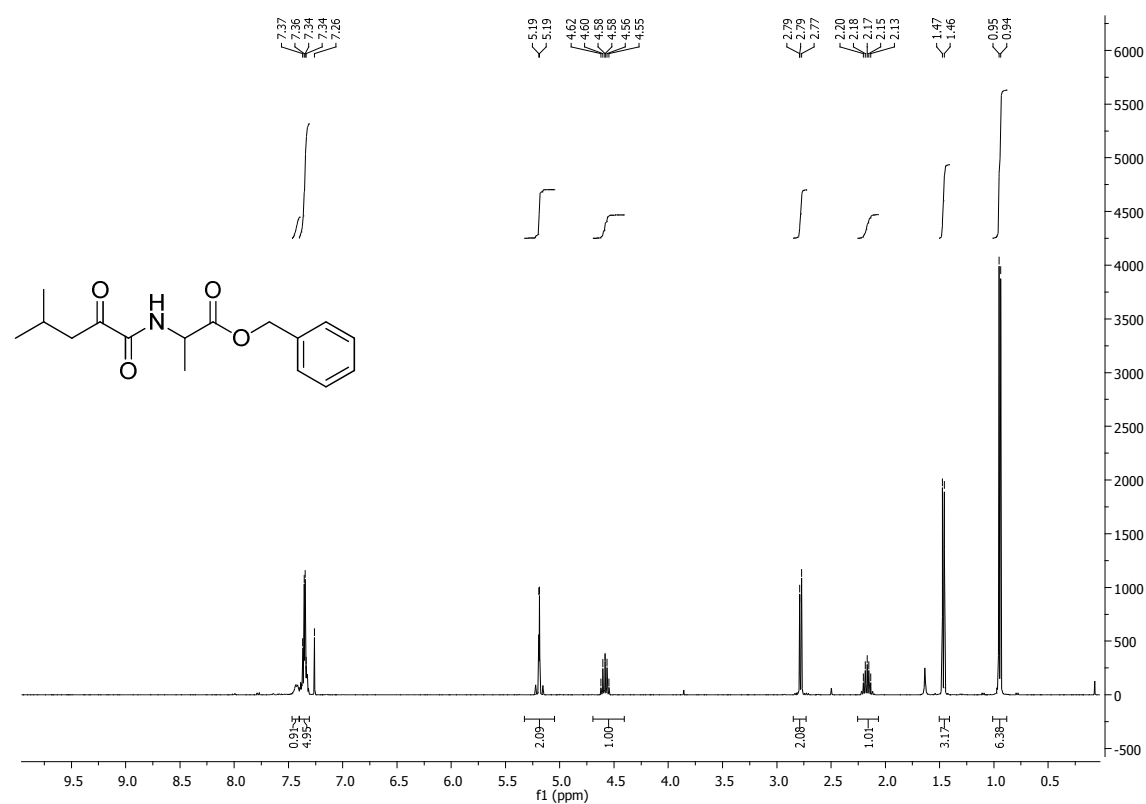
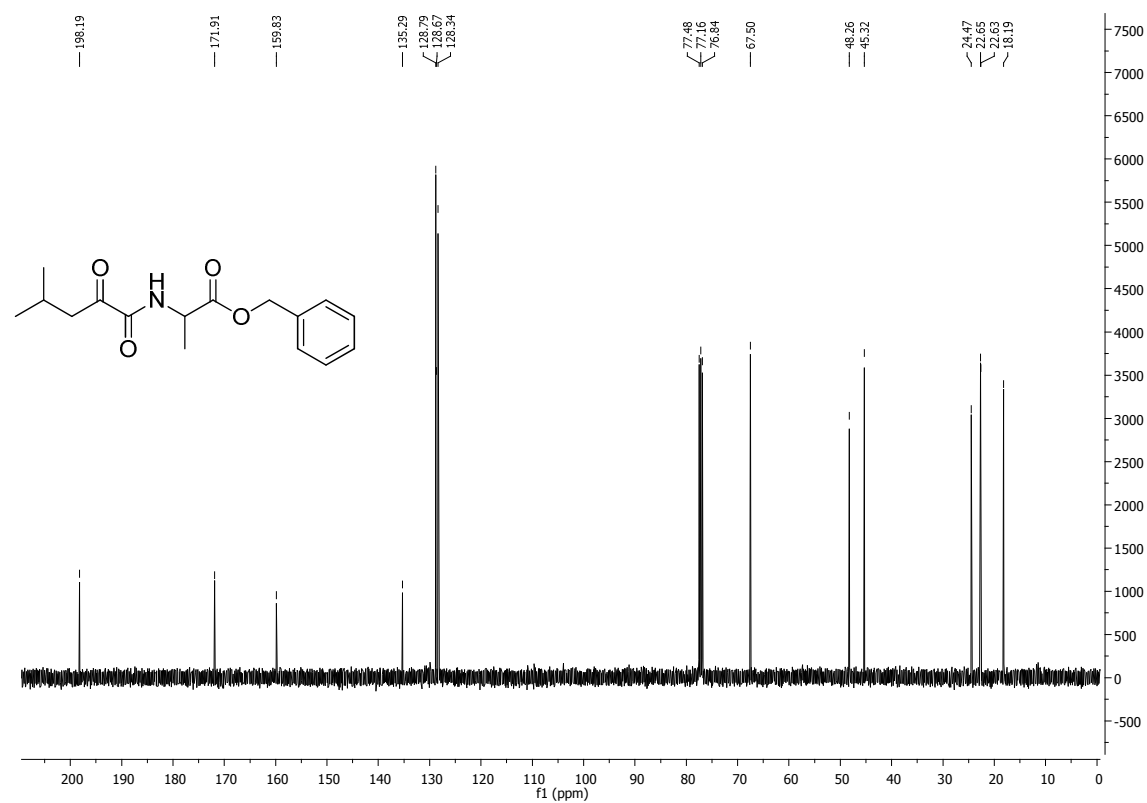
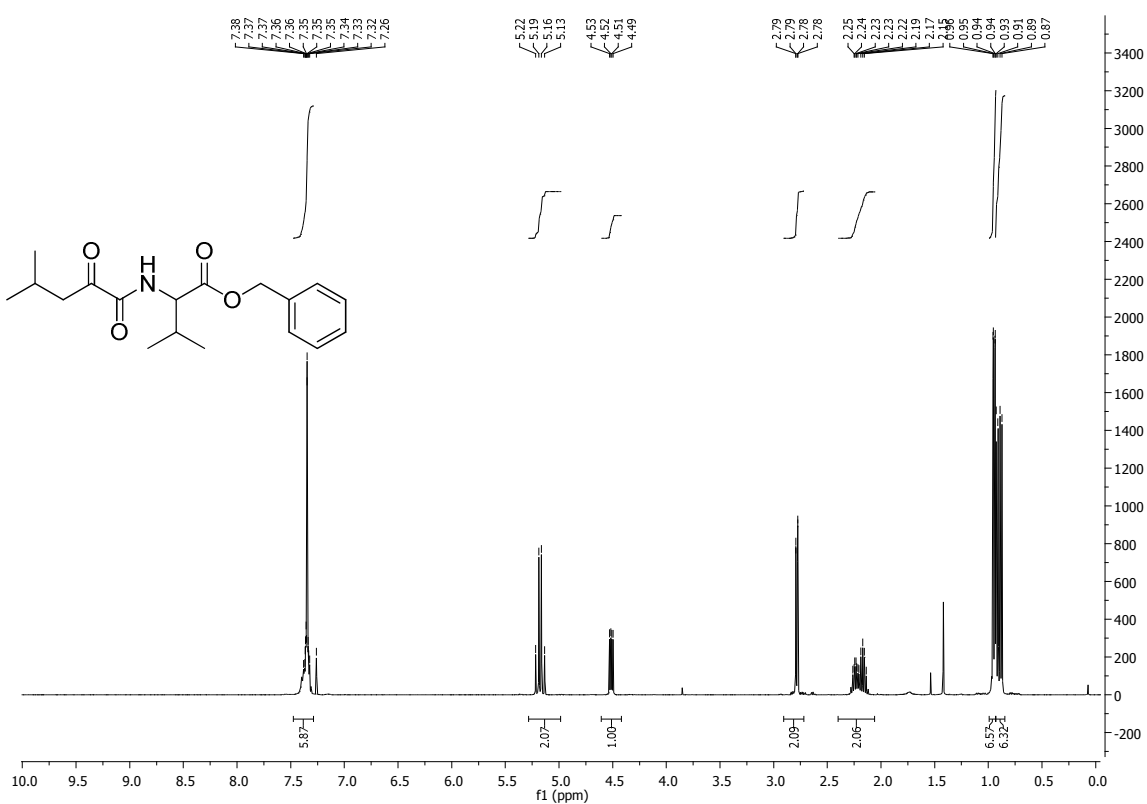
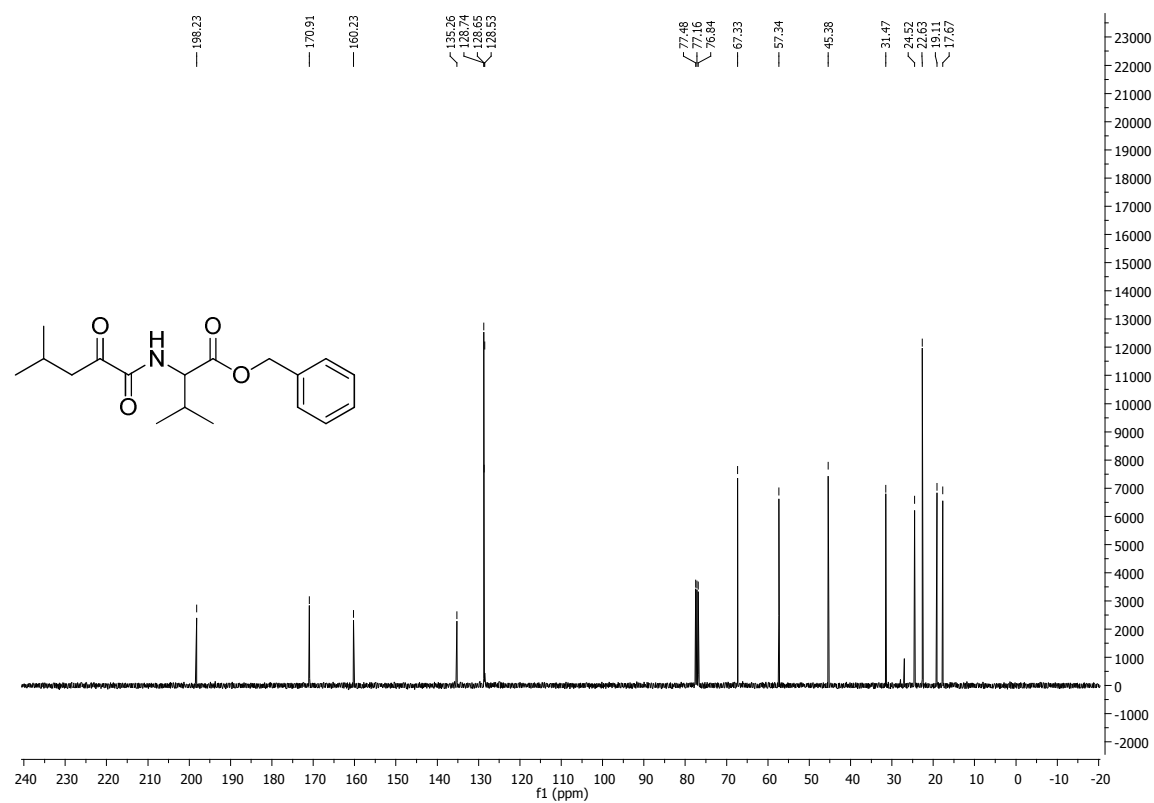
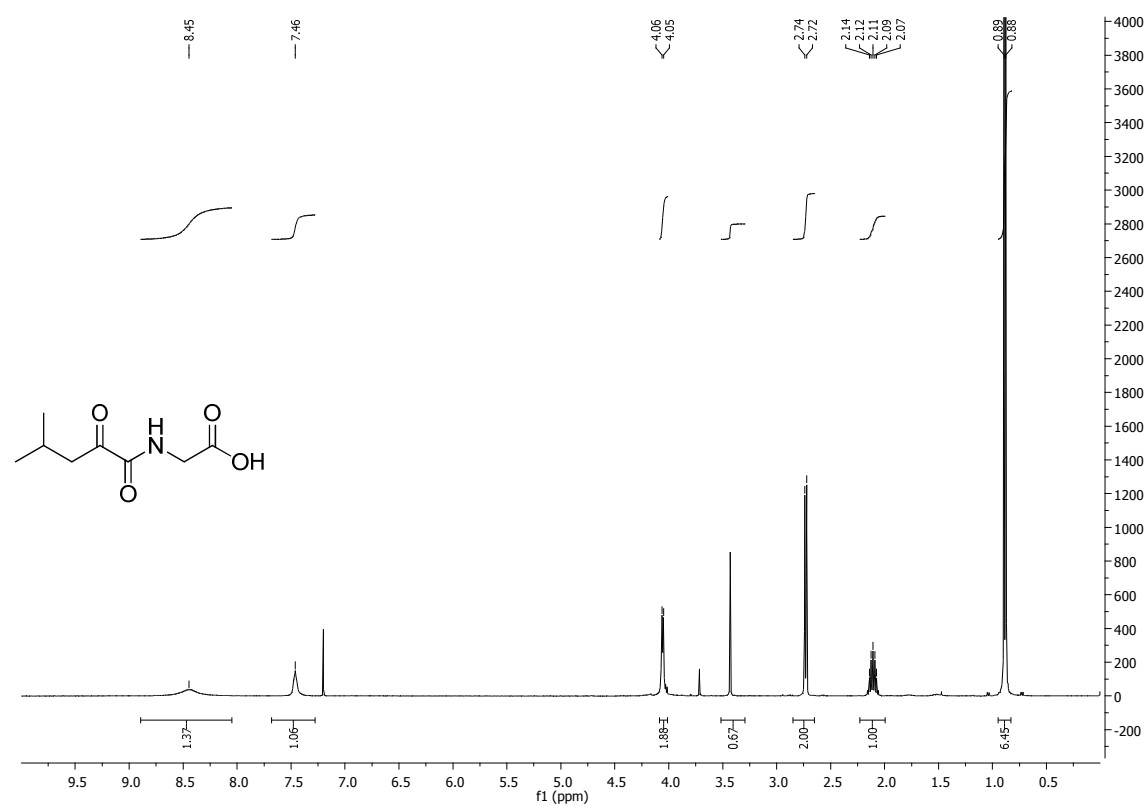
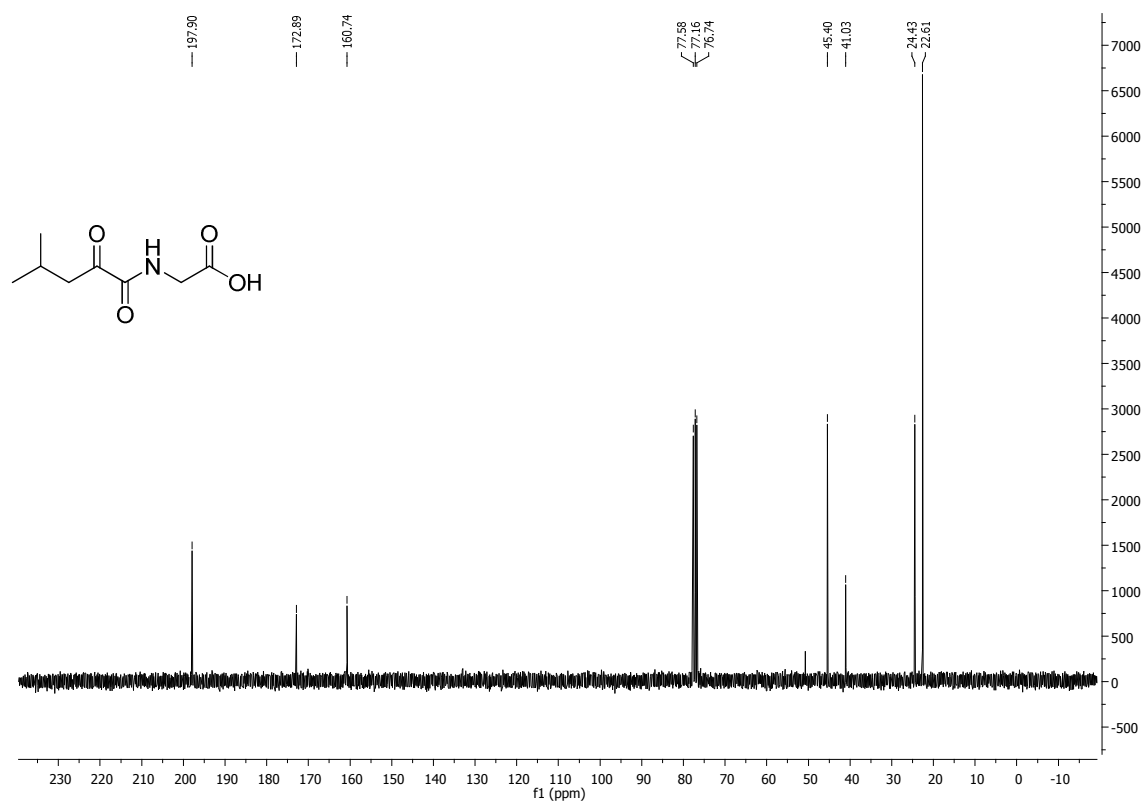
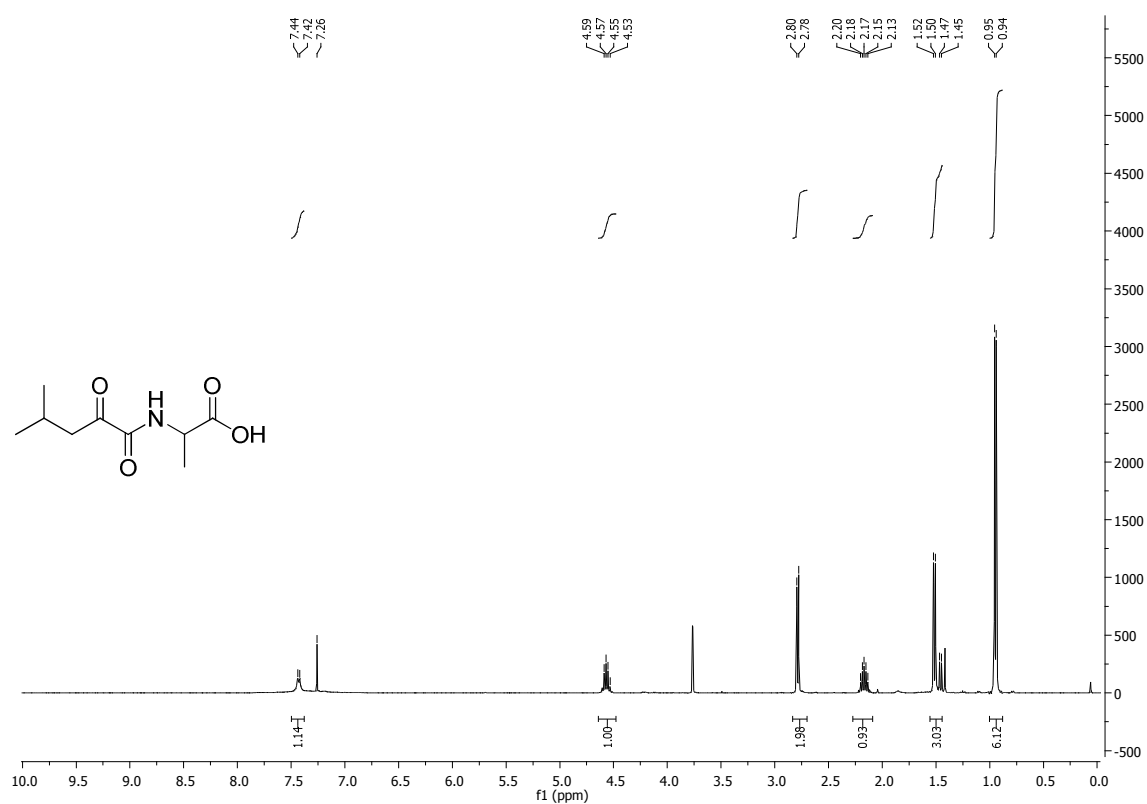


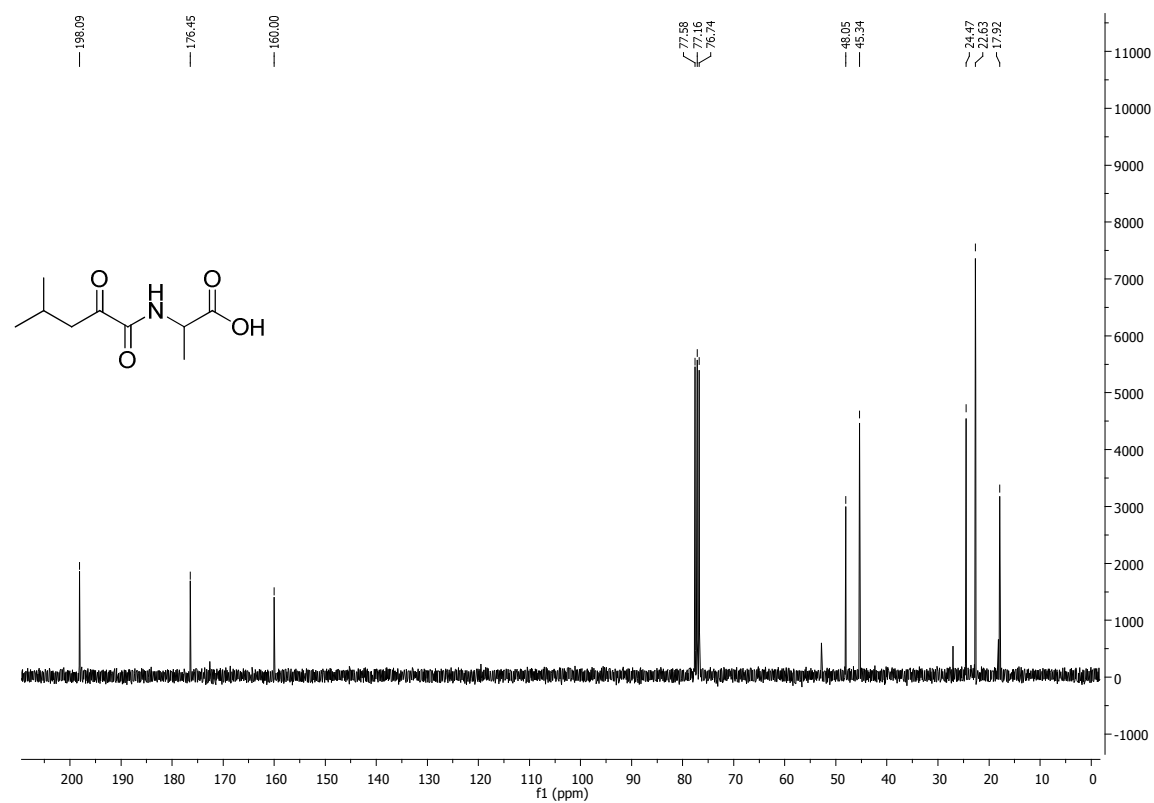
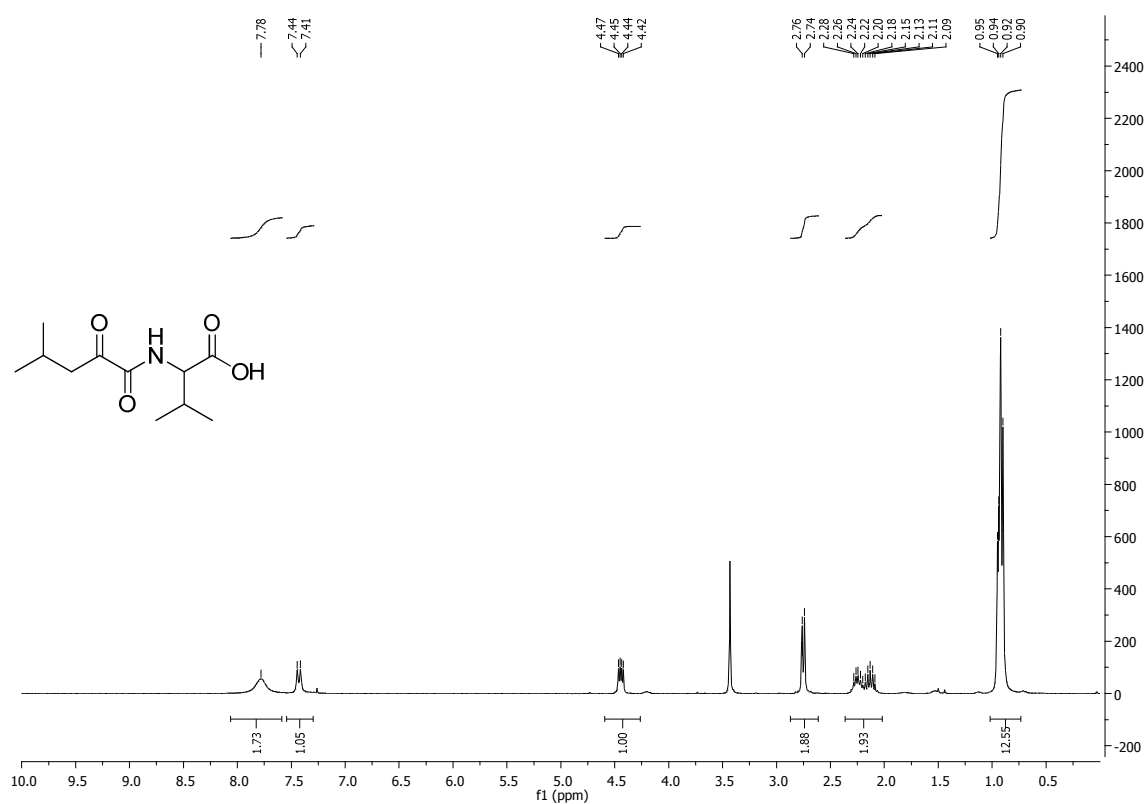
Abbildung 99: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Benzylesters **123a**.

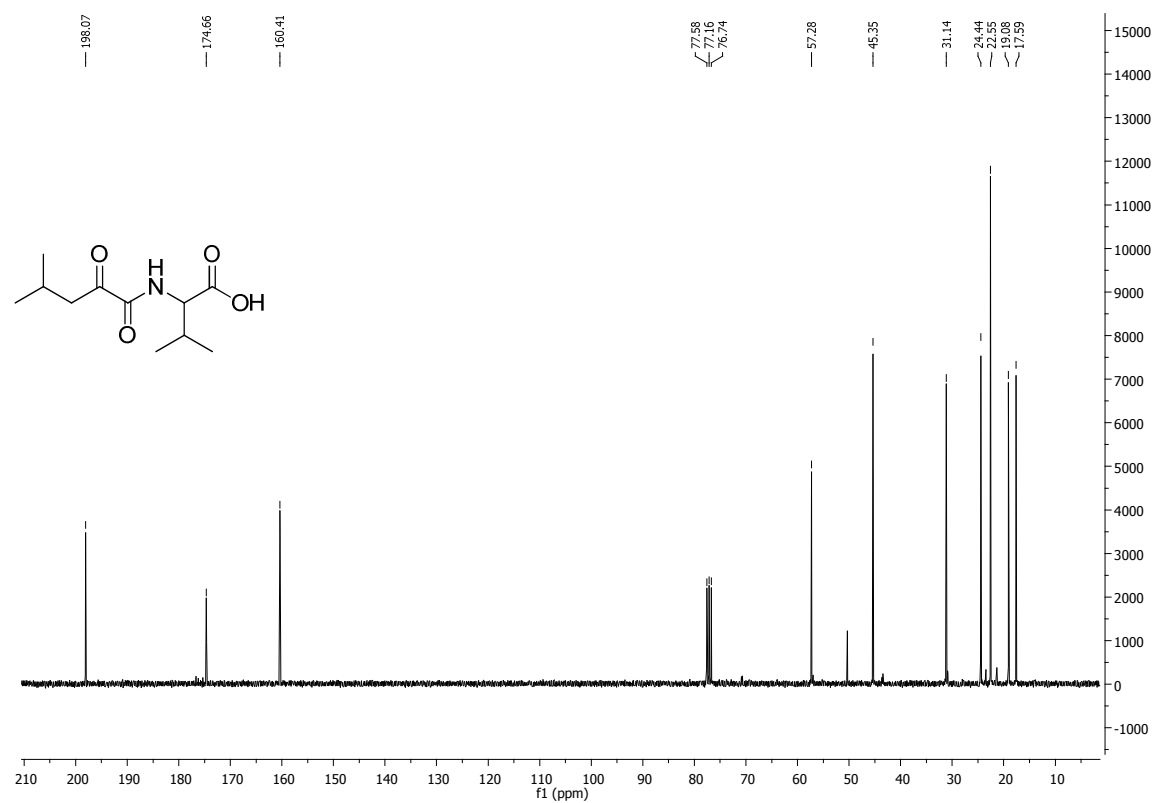
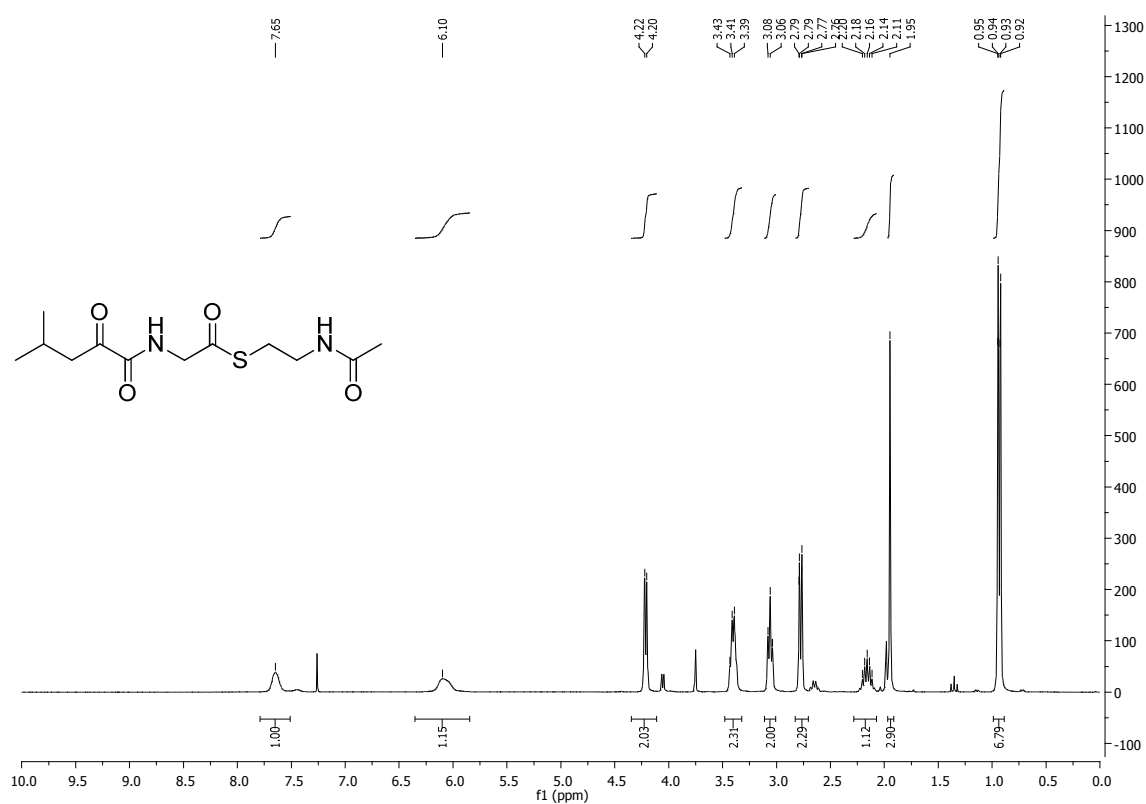
Abbildung 100: ¹³C-NMR-Spektrum (100 MHz) des Benzylesters **123a**.Abbildung 101: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Benzylesters **123b**.

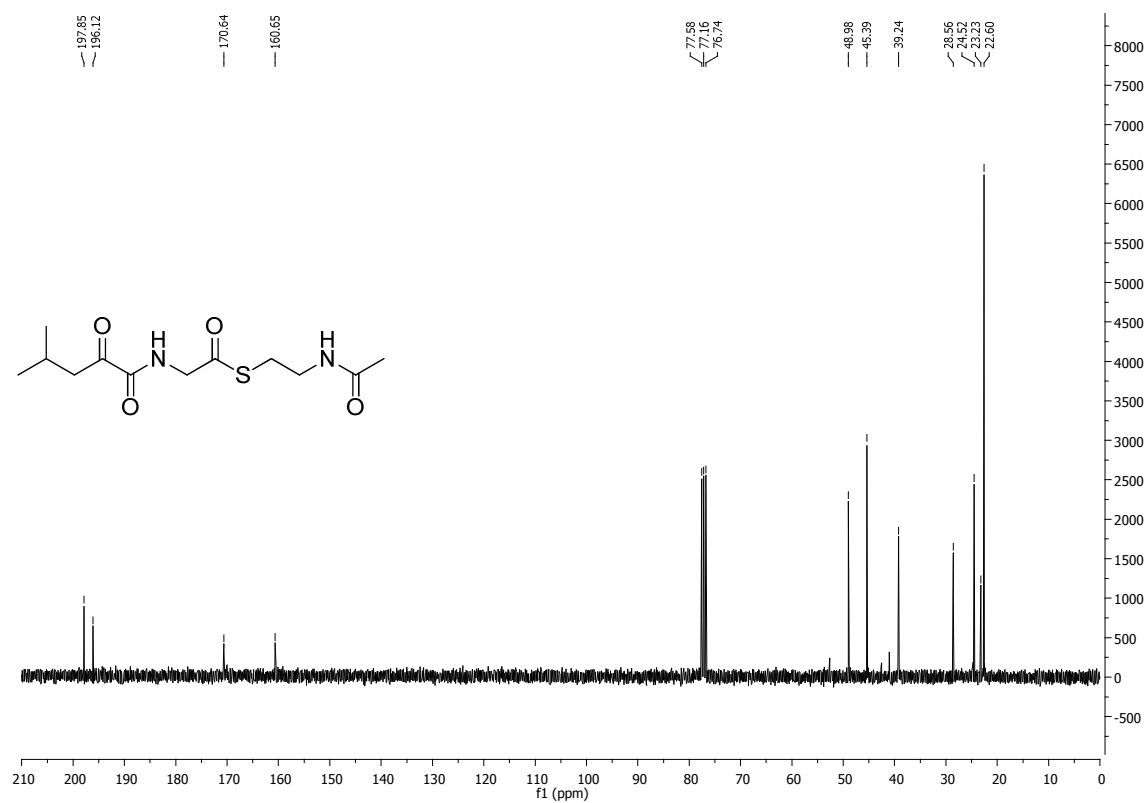
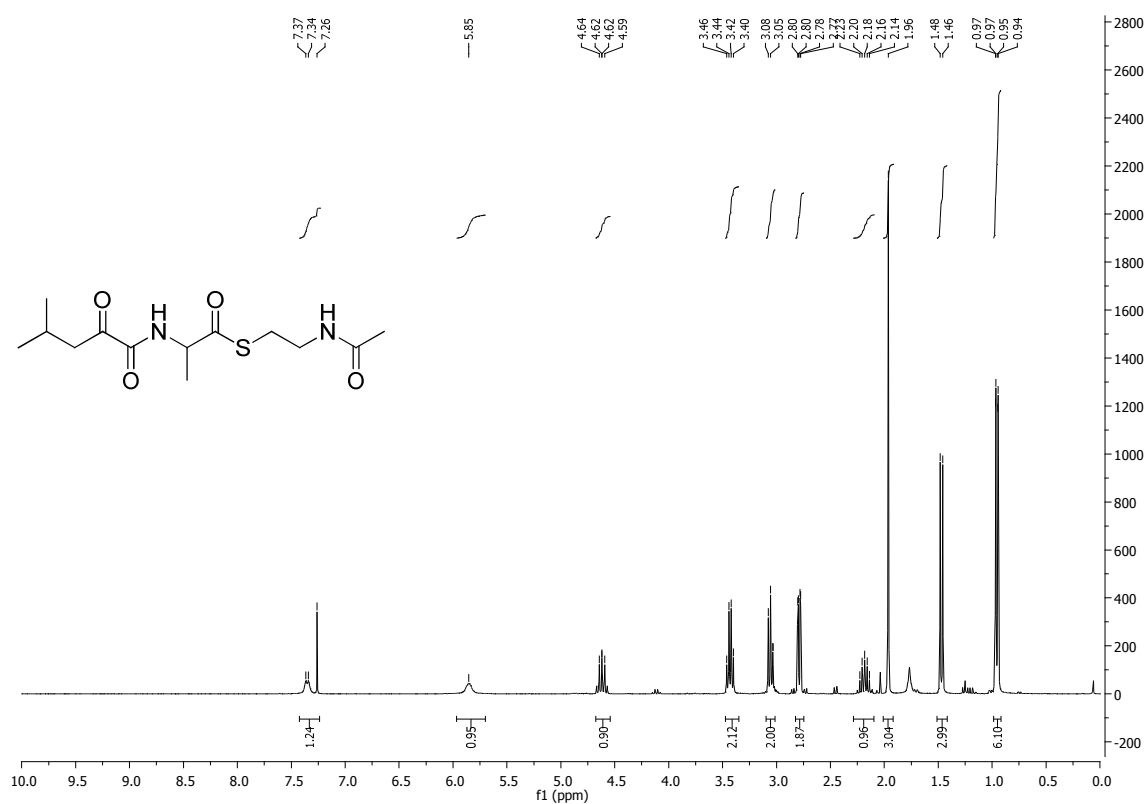
Abbildung 102: ¹³C-NMR-Spektrum (100 MHz) des Benzylesters 123b.Abbildung 103: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Benzylesters 123c.

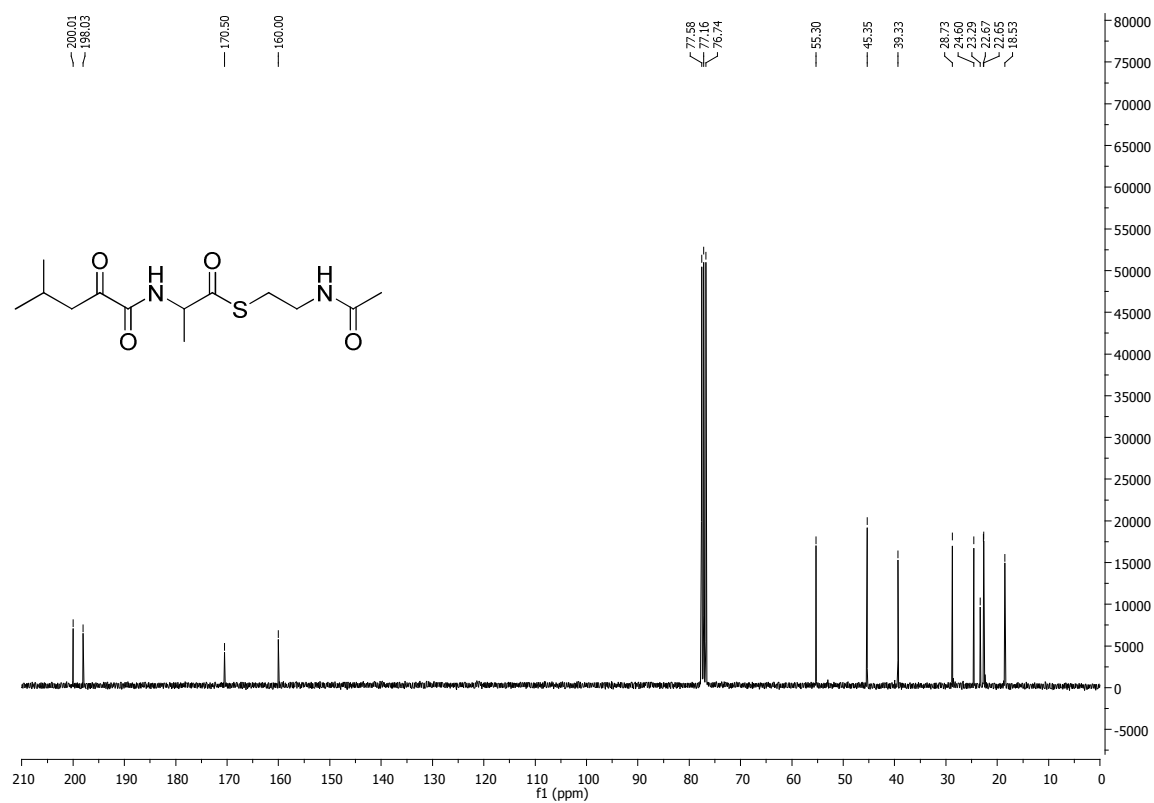
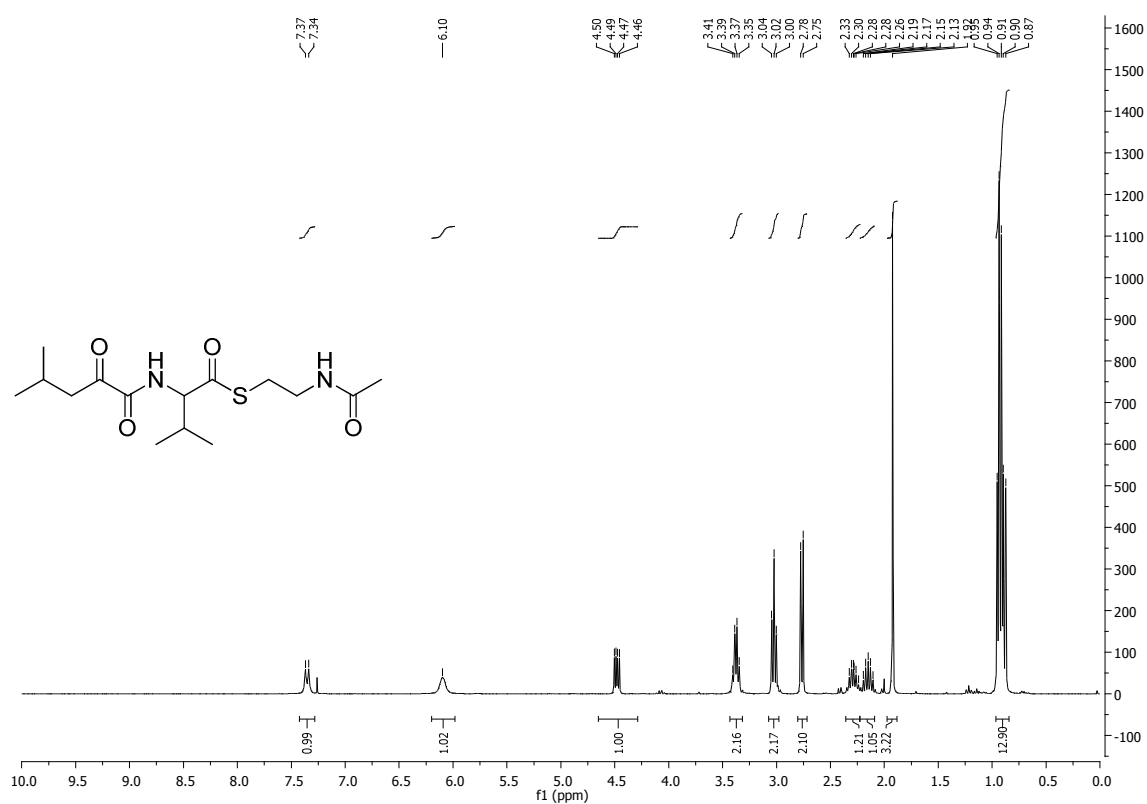
Abbildung 104: ¹³C-NMR-Spektrum (100 MHz) des Benzylesters 123c.Abbildung 105: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure 124a.

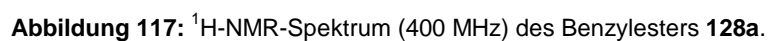
Abbildung 106: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) der Säure 124a.Abbildung 107: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure 124b.

Abbildung 108: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) der Säure 124b.Abbildung 109: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure 124c.

Abbildung 110: ¹³C-NMR-Spektrum (100 MHz) der Säure **124c**.Abbildung 111: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters **64a**.

Abbildung 112: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters **64a**.Abbildung 113: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters **64b**.

Abbildung 114: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters **64b**.Abbildung 115: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters **64c**.



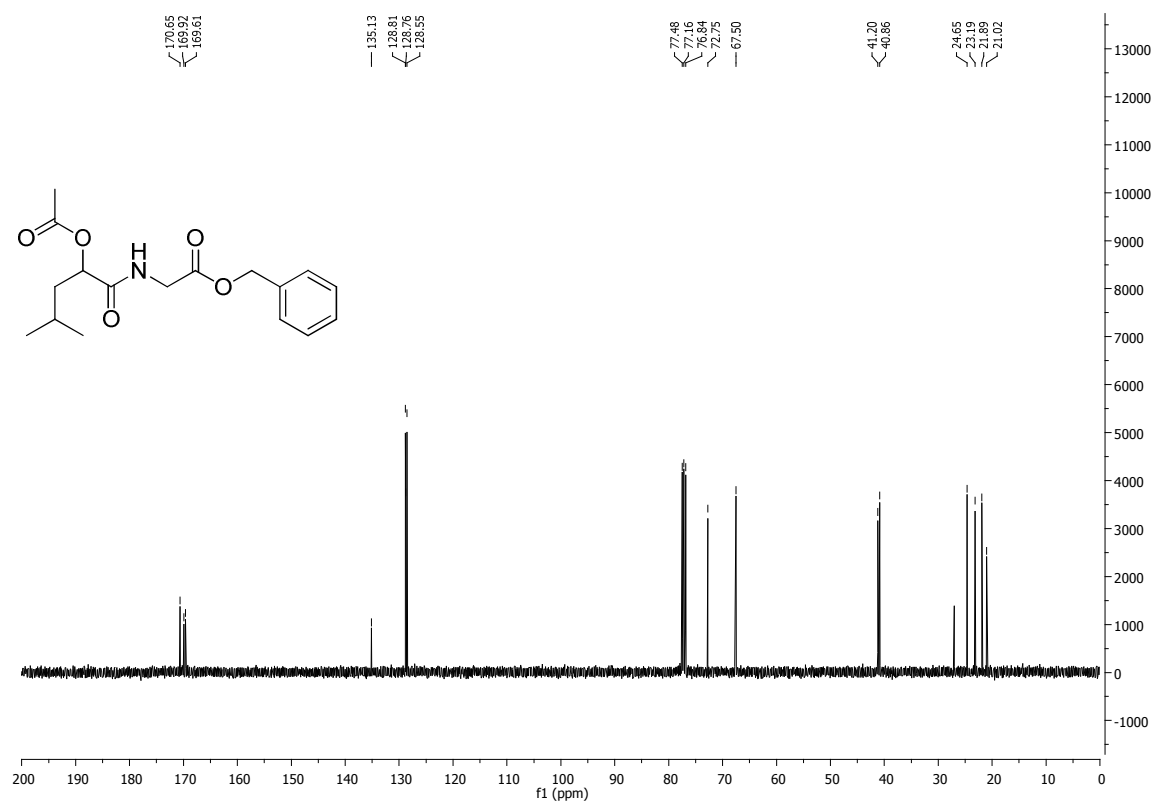


Abbildung 118: ¹³C-NMR-Spektrum (100 MHz) des Benzylesters **128a**.

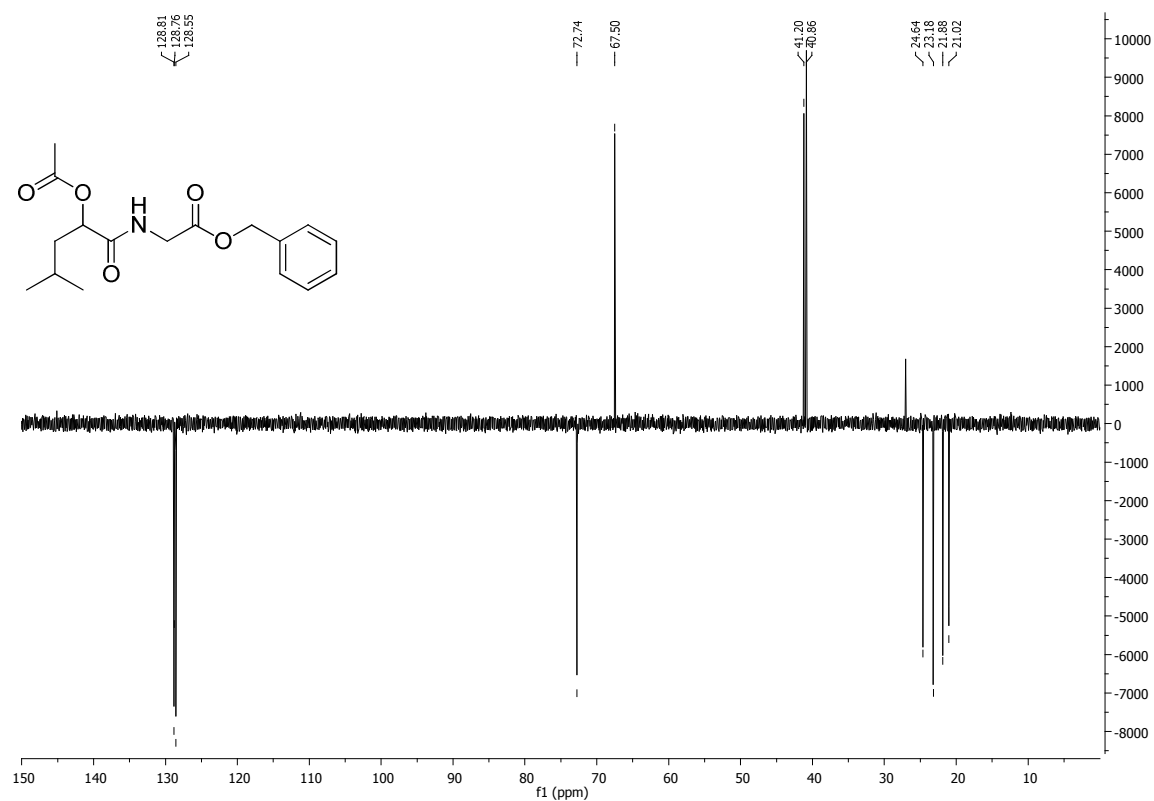
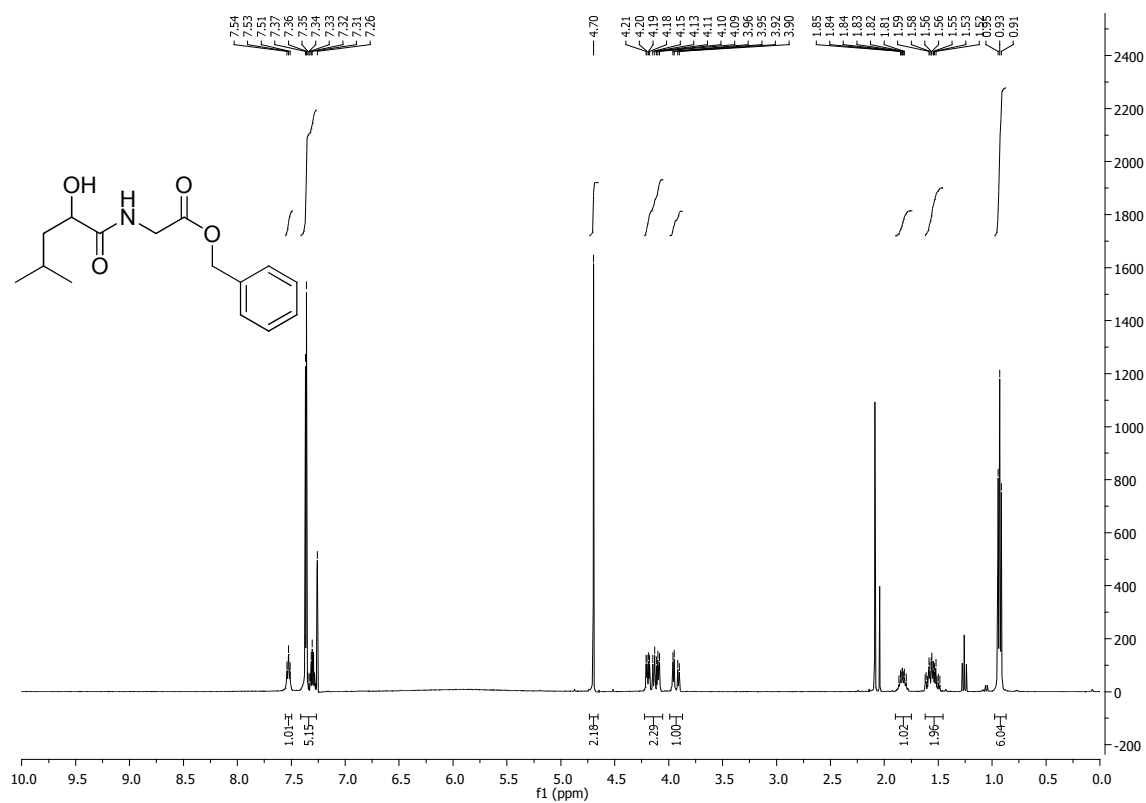
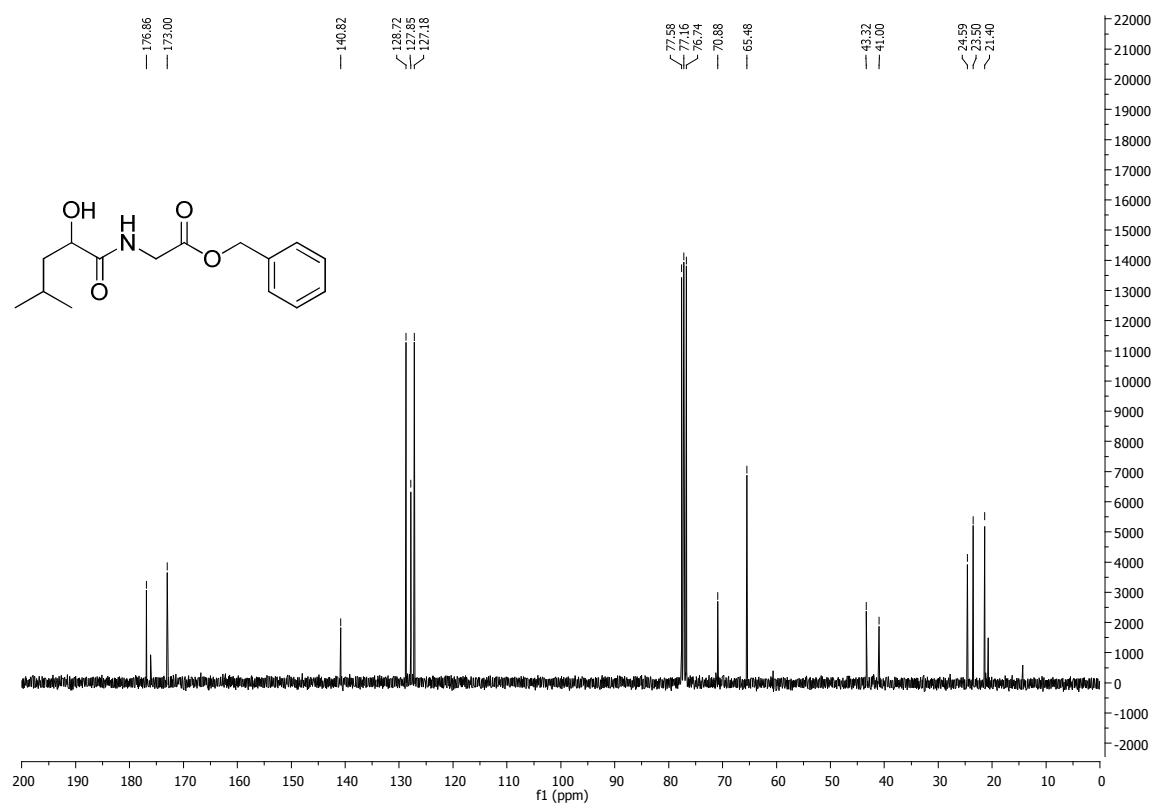


Abbildung 119: DEPT-135-Spektrum (100 MHz) des Benzylesters **128a**.

Abbildung 120: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Benzylesters 128b.Abbildung 121: ¹³C-NMR-Spektrum (100 MHz) des Benzylesters 128b.

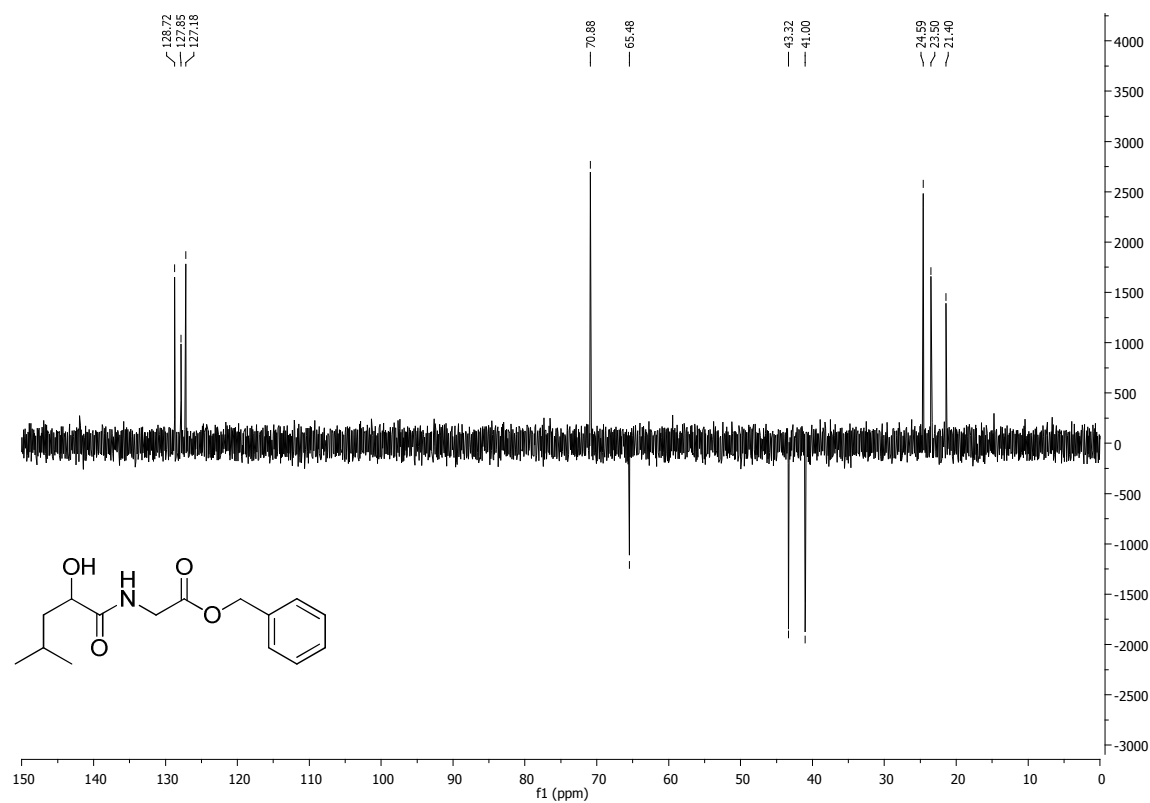
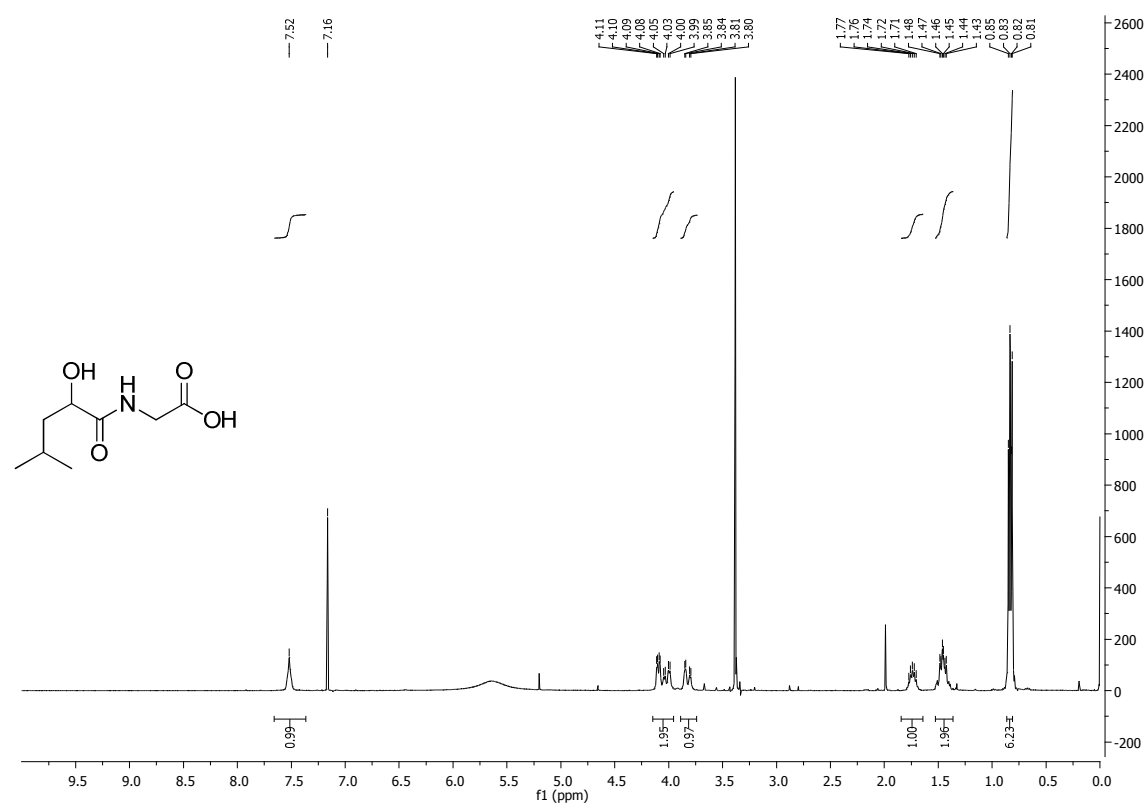


Abbildung 122: DEPT-135-Spektrum (100 MHz) des Benzylesters 128b.

Abbildung 123: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure 129.

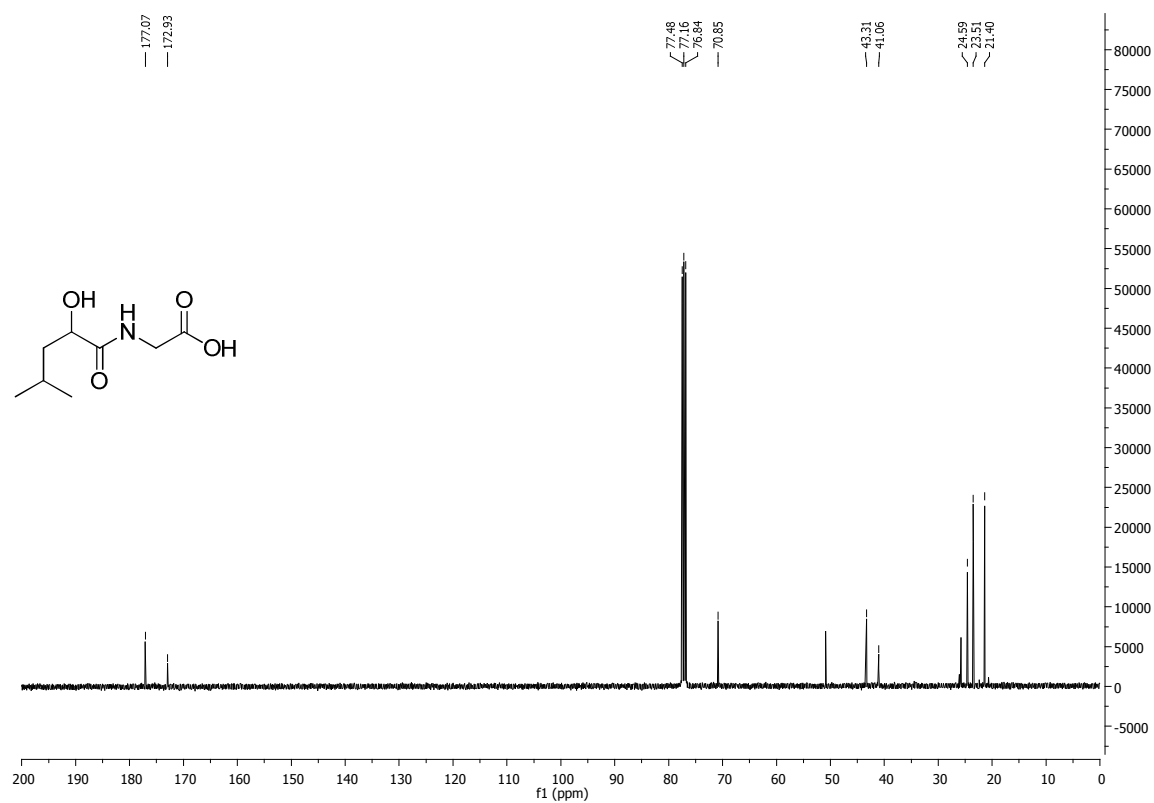


Abbildung 124: ¹³C-NMR-Spektrum (100 MHz) der Säure 129.

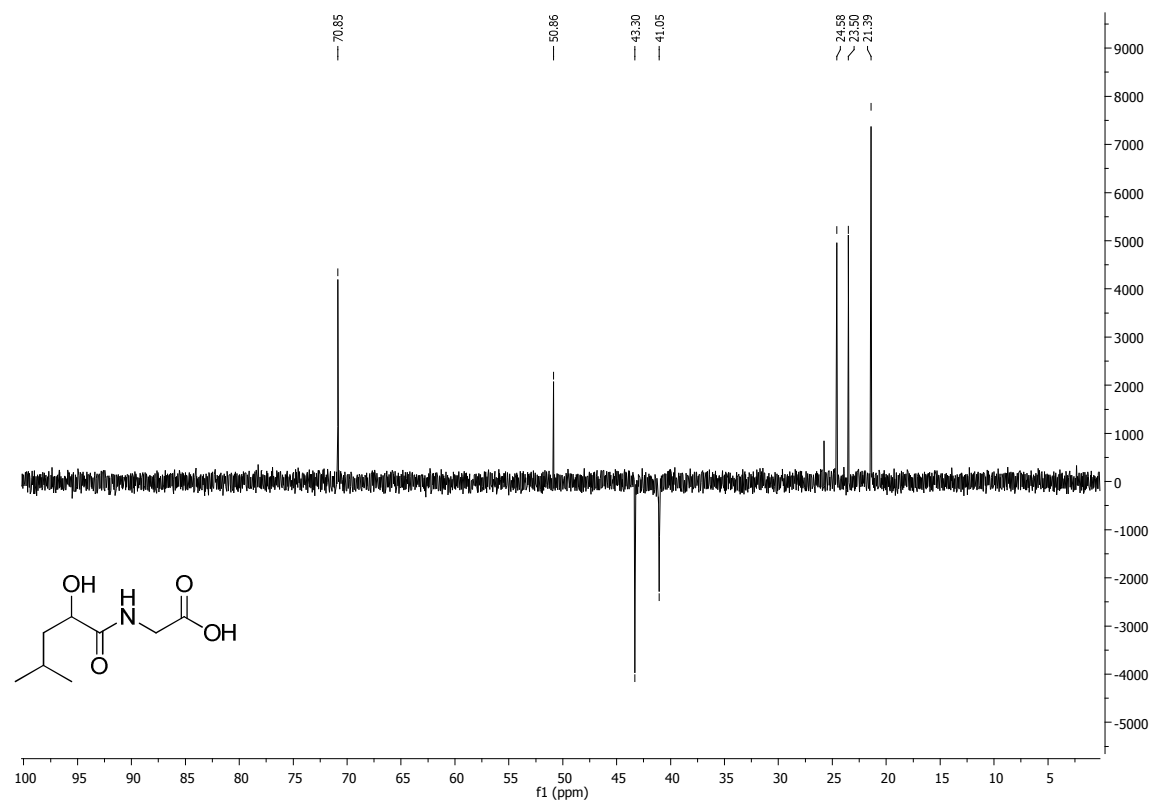
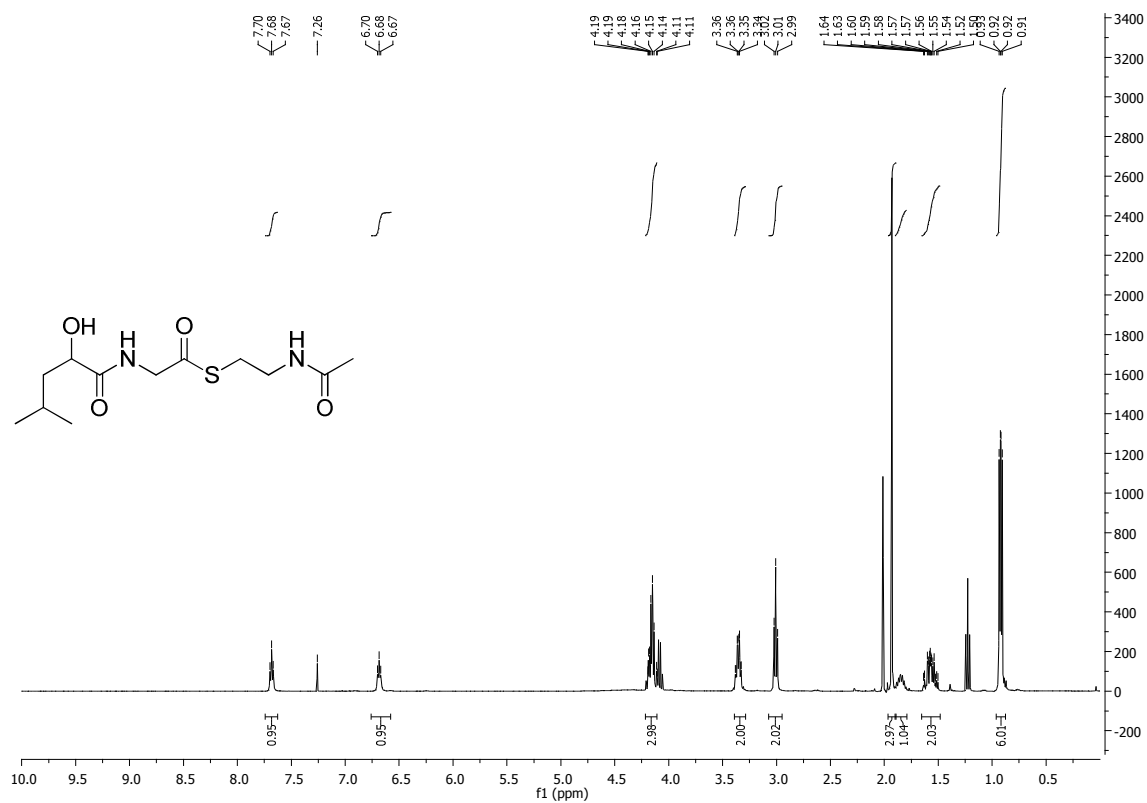
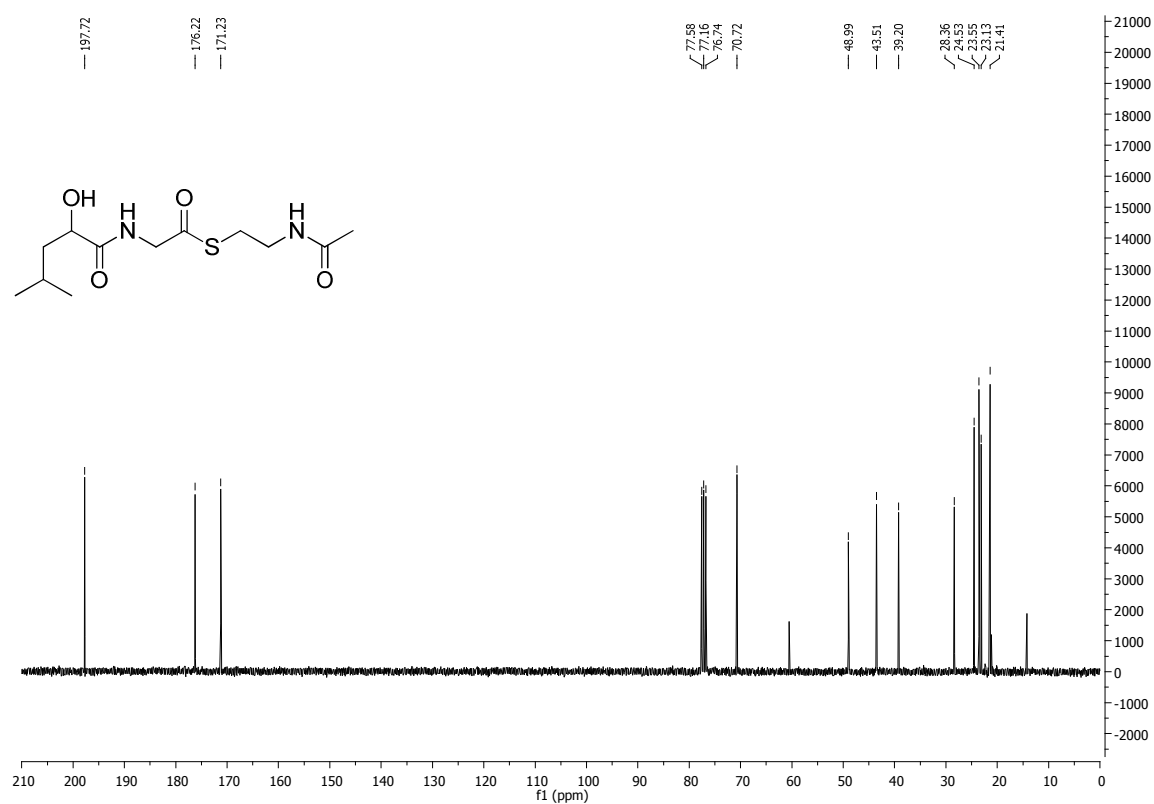
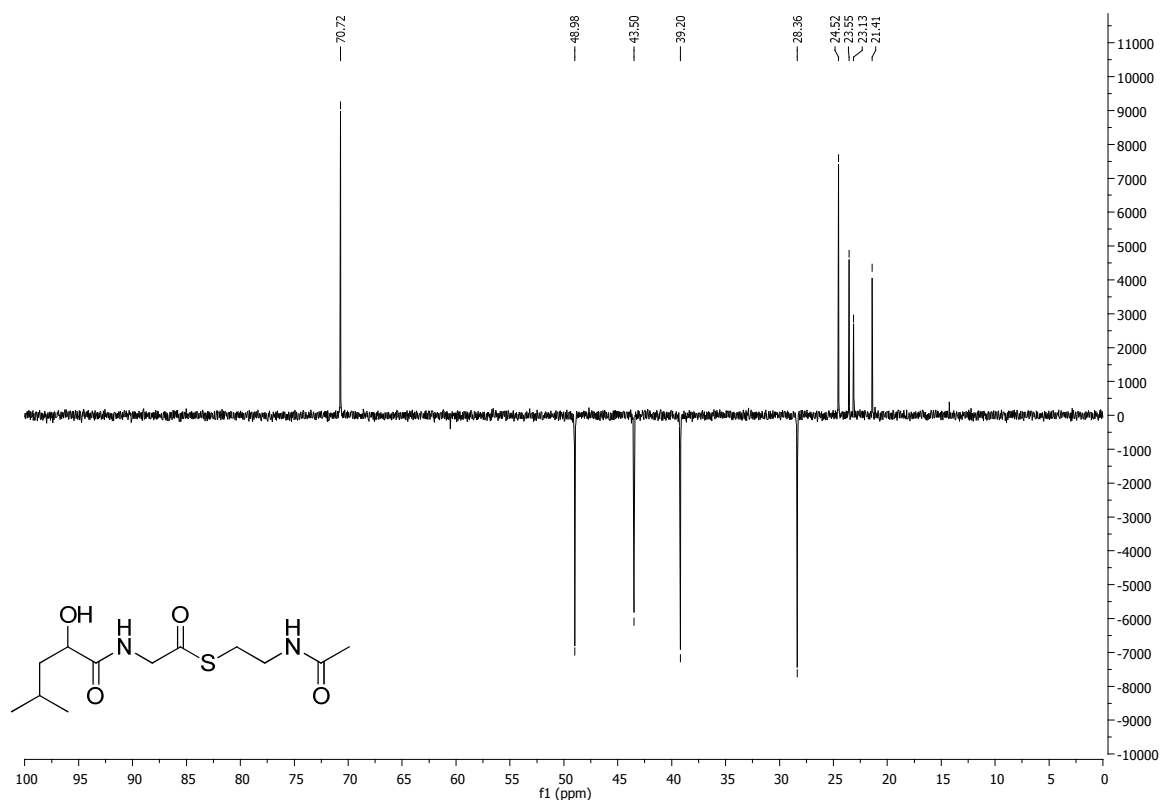
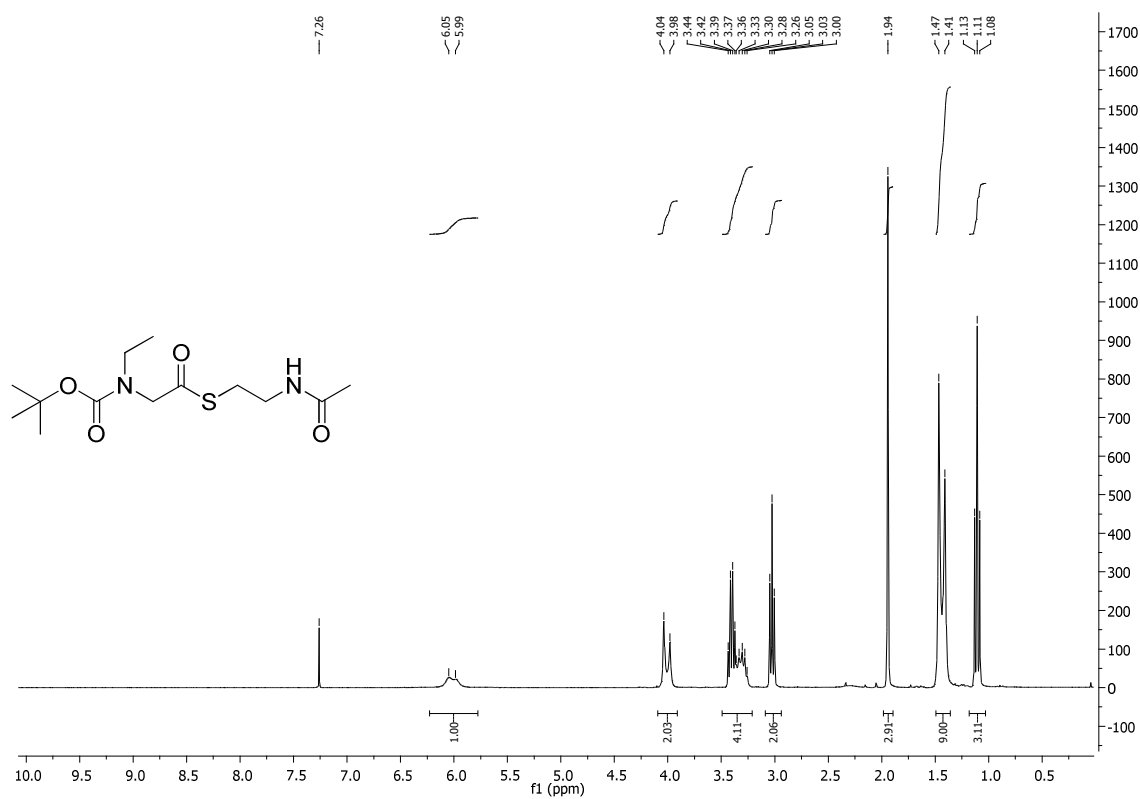


Abbildung 125: DEPT-135-Spektrum (100 MHz) der Säure 129.

Abbildung 126: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters **69**.Abbildung 127: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters **69**.

Abbildung 128: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Thioesters **69**.Abbildung 129: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Glycinderivats **126**.

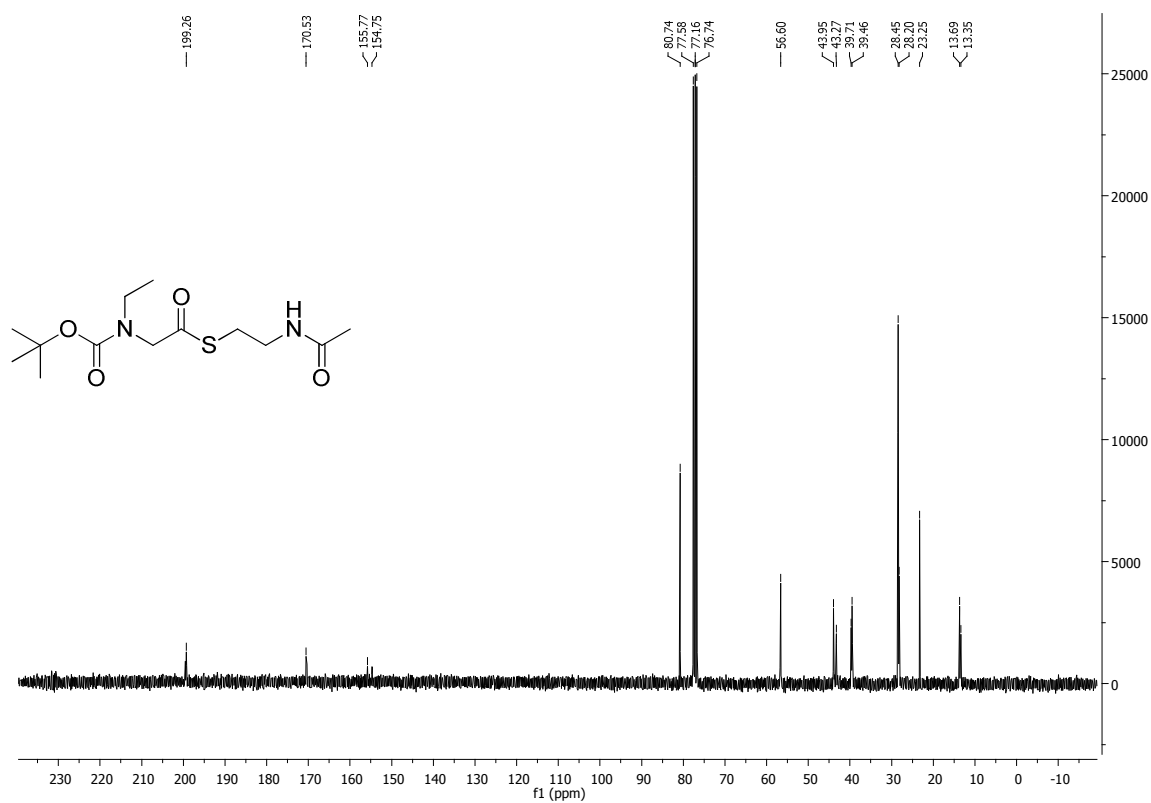


Abbildung 130: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Glycinderivats 126.

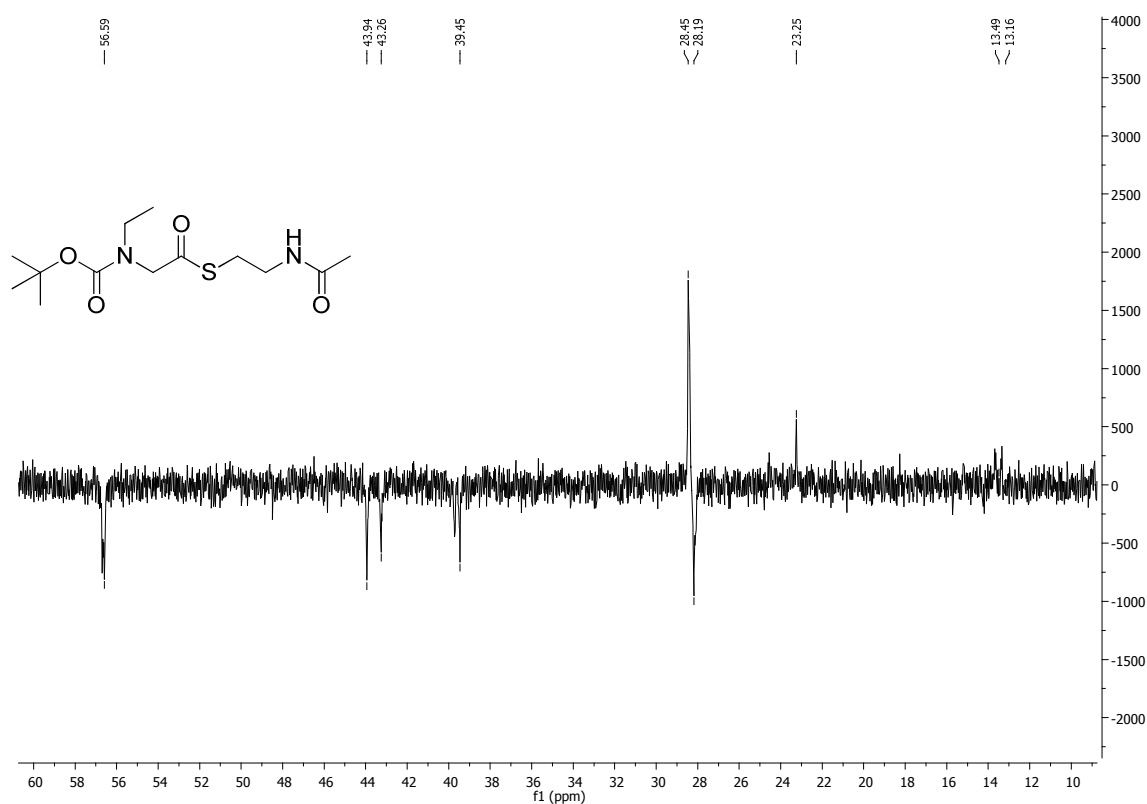
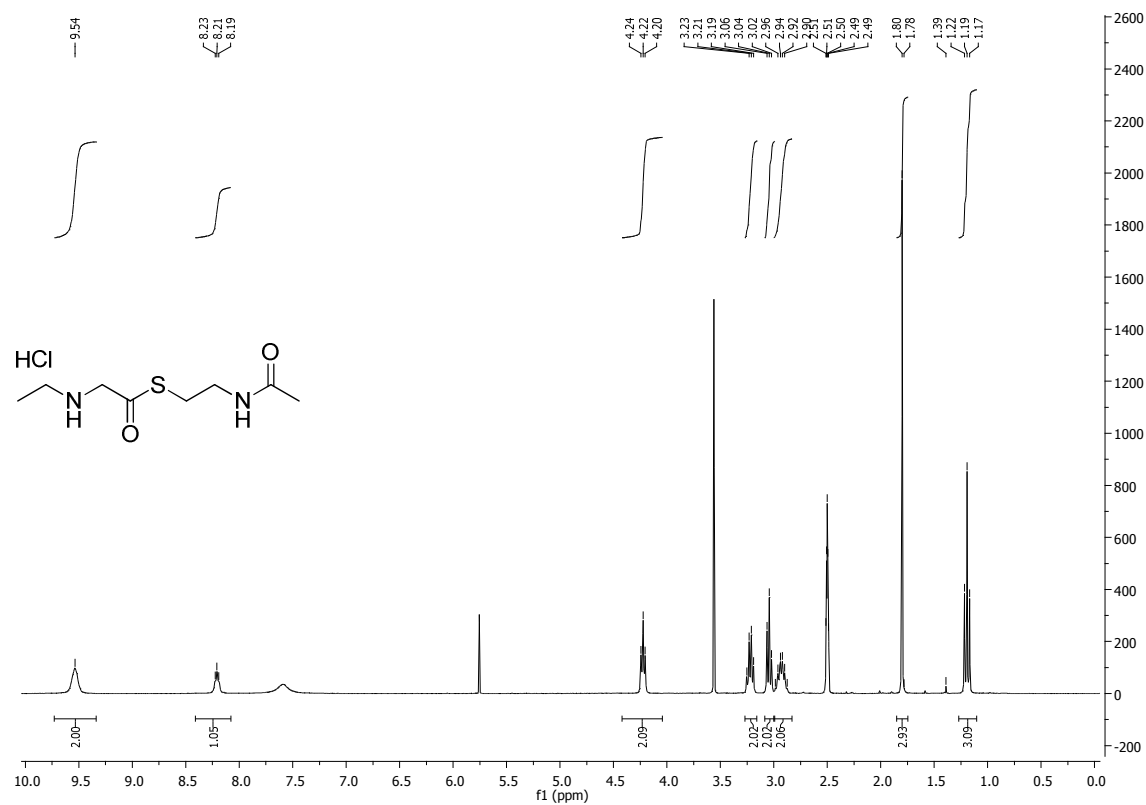
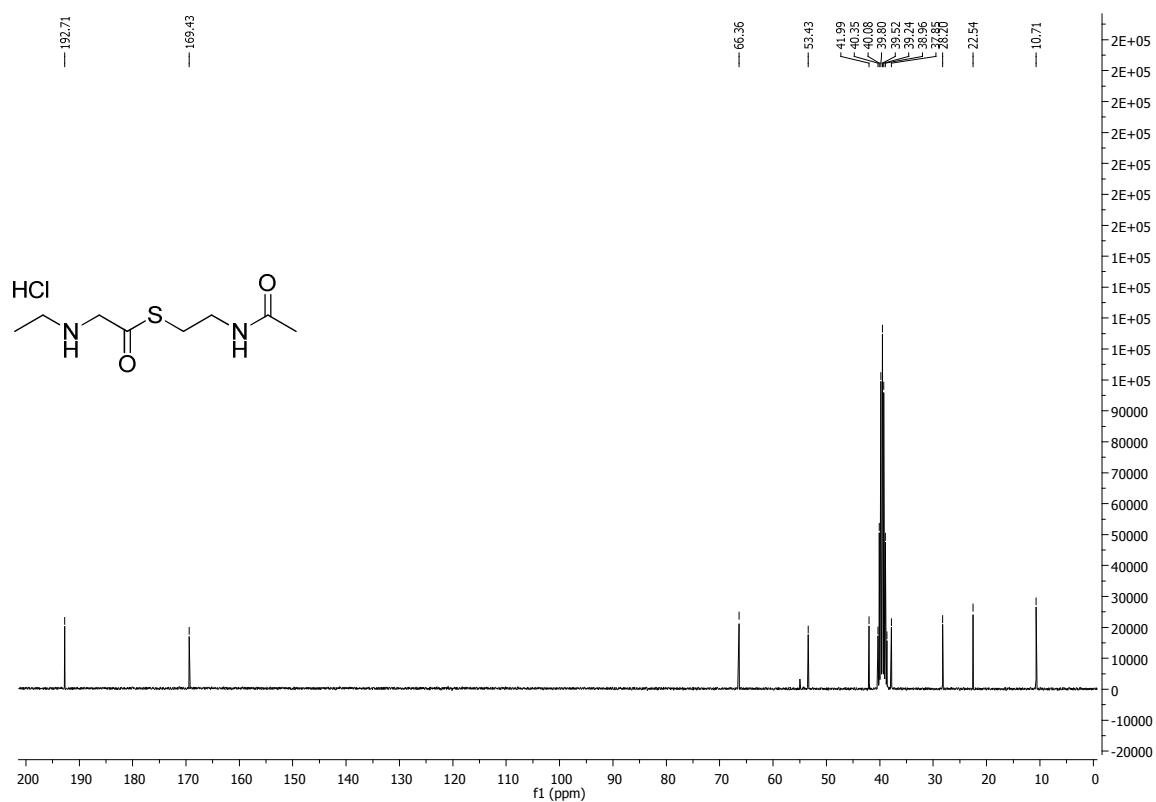
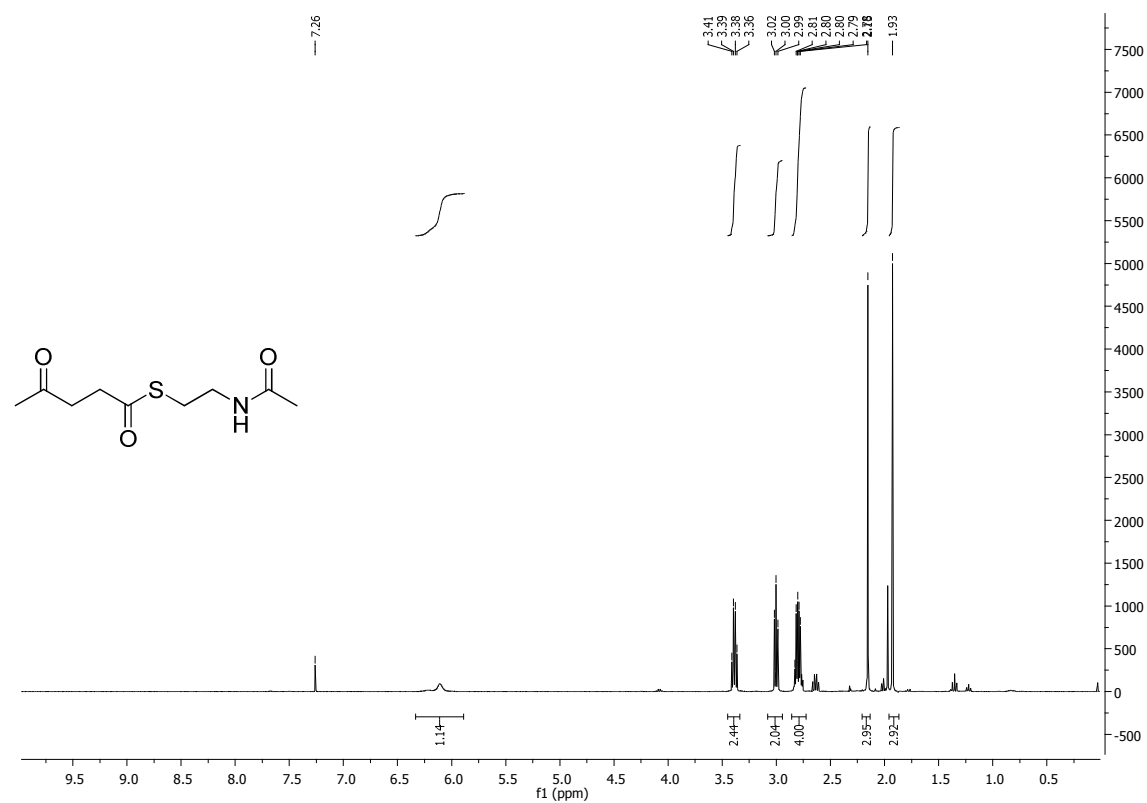
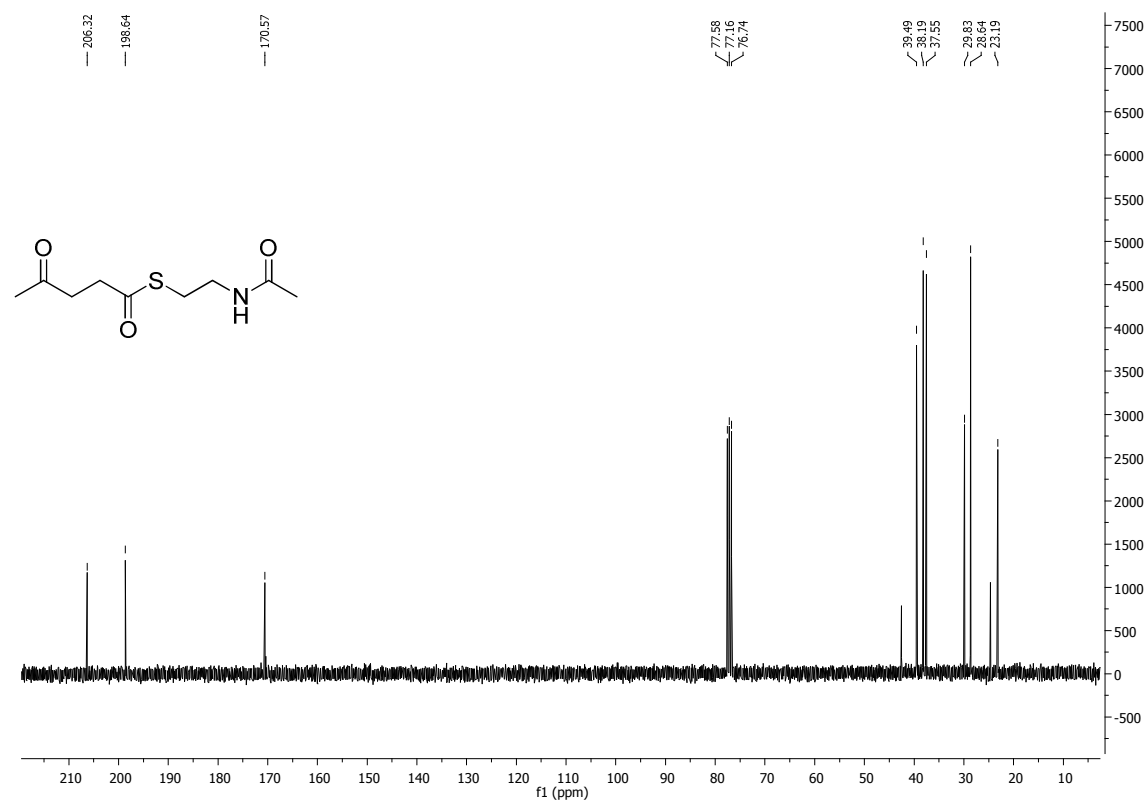
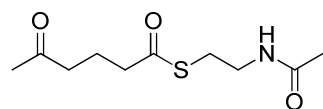


Abbildung 131: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Glycinderivats 126.

Abbildung 132: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Glycinthioesters **65**.Abbildung 133: ¹³C-NMR-Spektrum (100 MHz) des Glycinthioesters **65**.

Abbildung 134: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters **66**.Abbildung 135: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters **66**.



— 207.88
— 199.53
— 170.41

CC(=O)CCCC(=O)SCCN(C)C=O

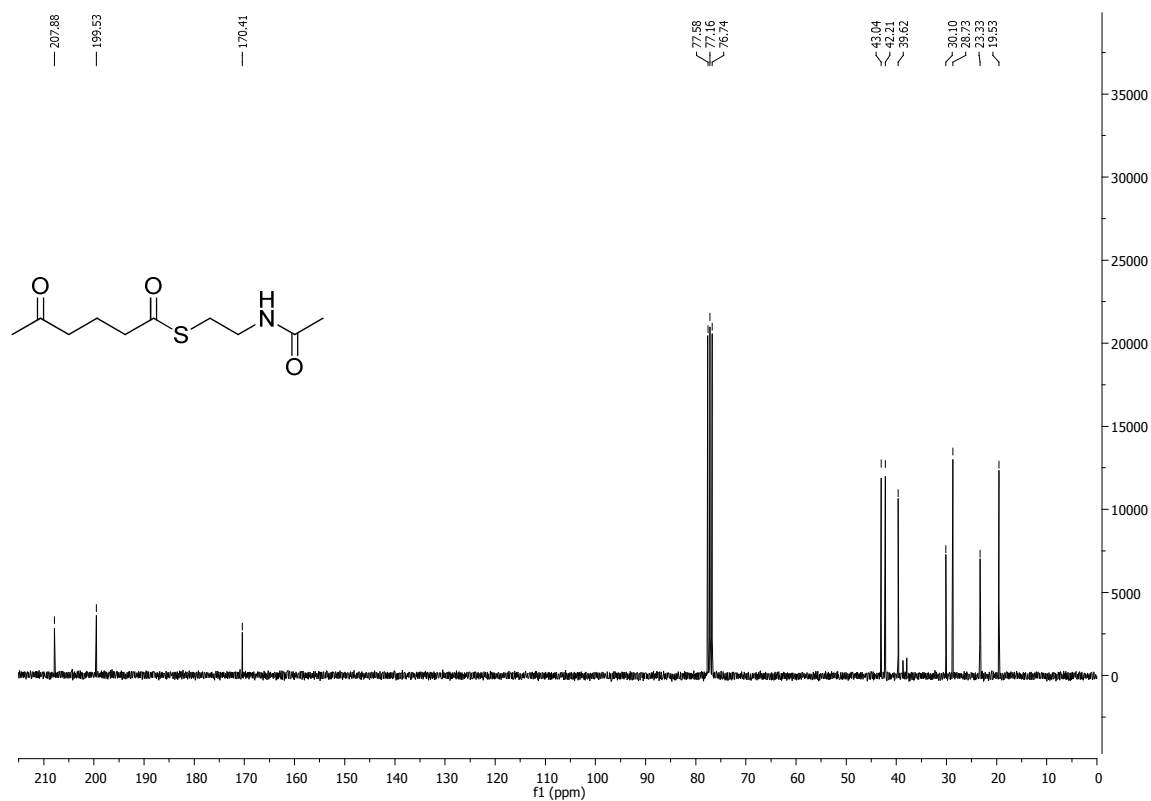
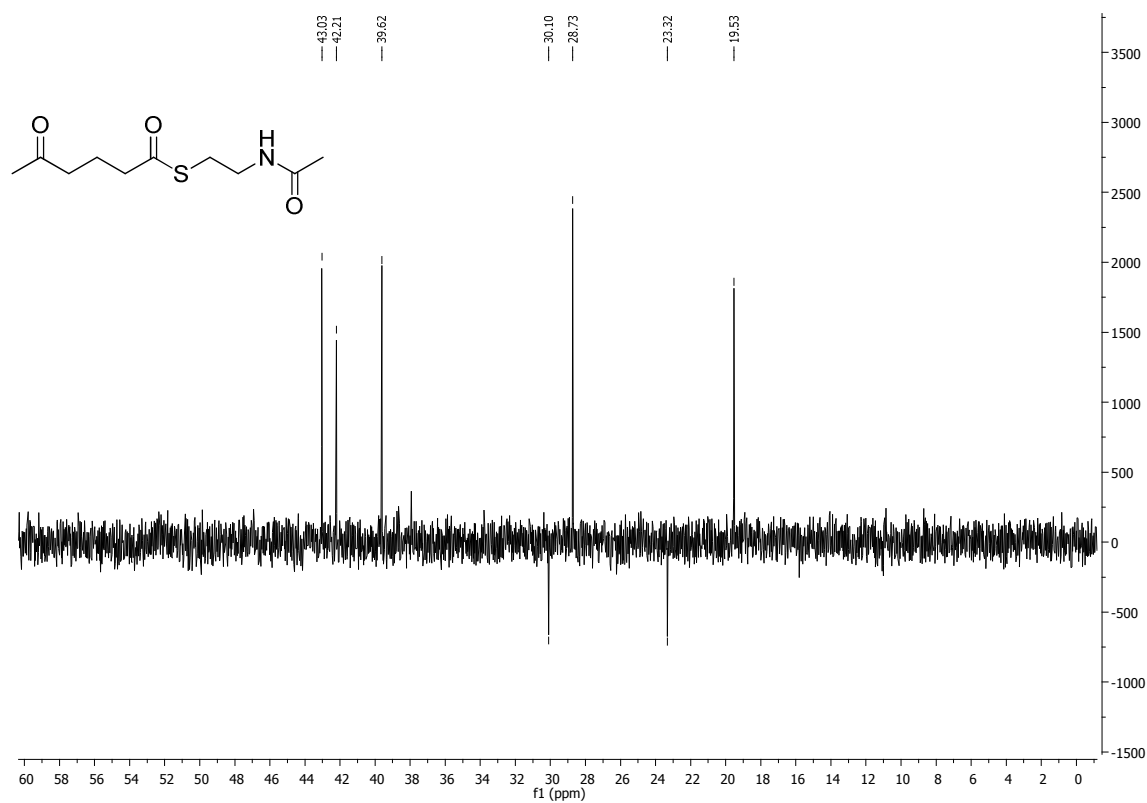
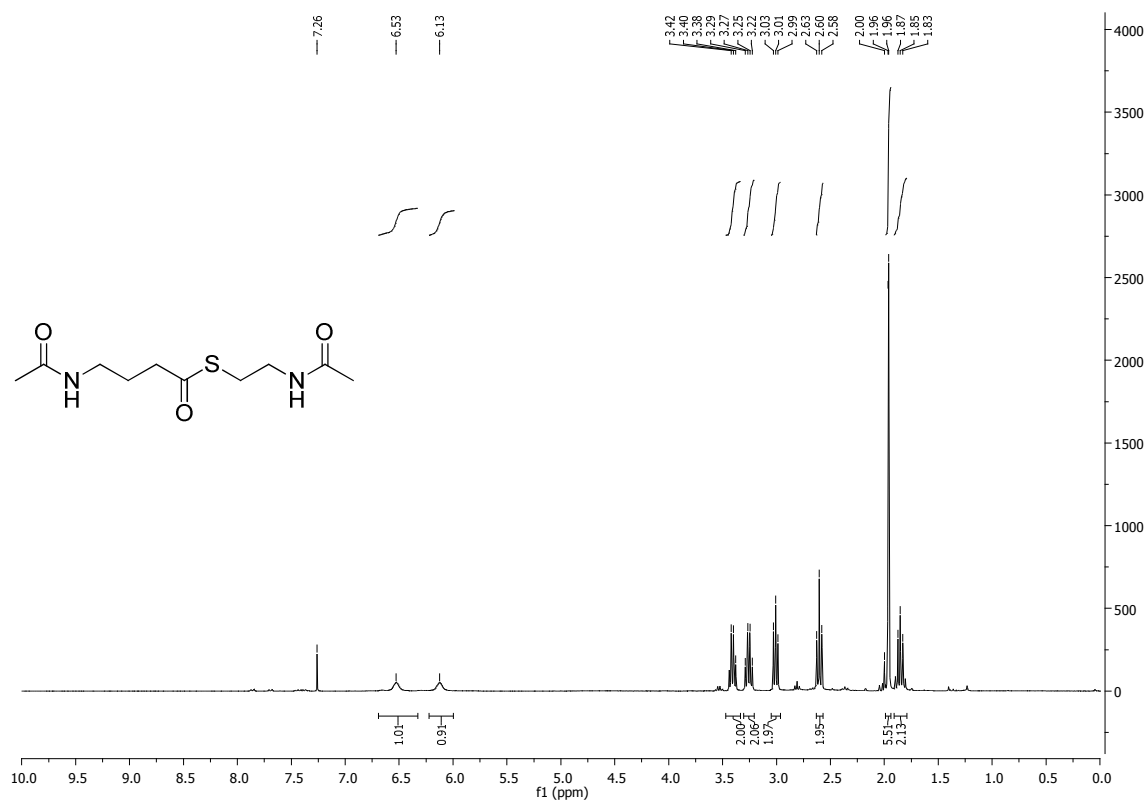
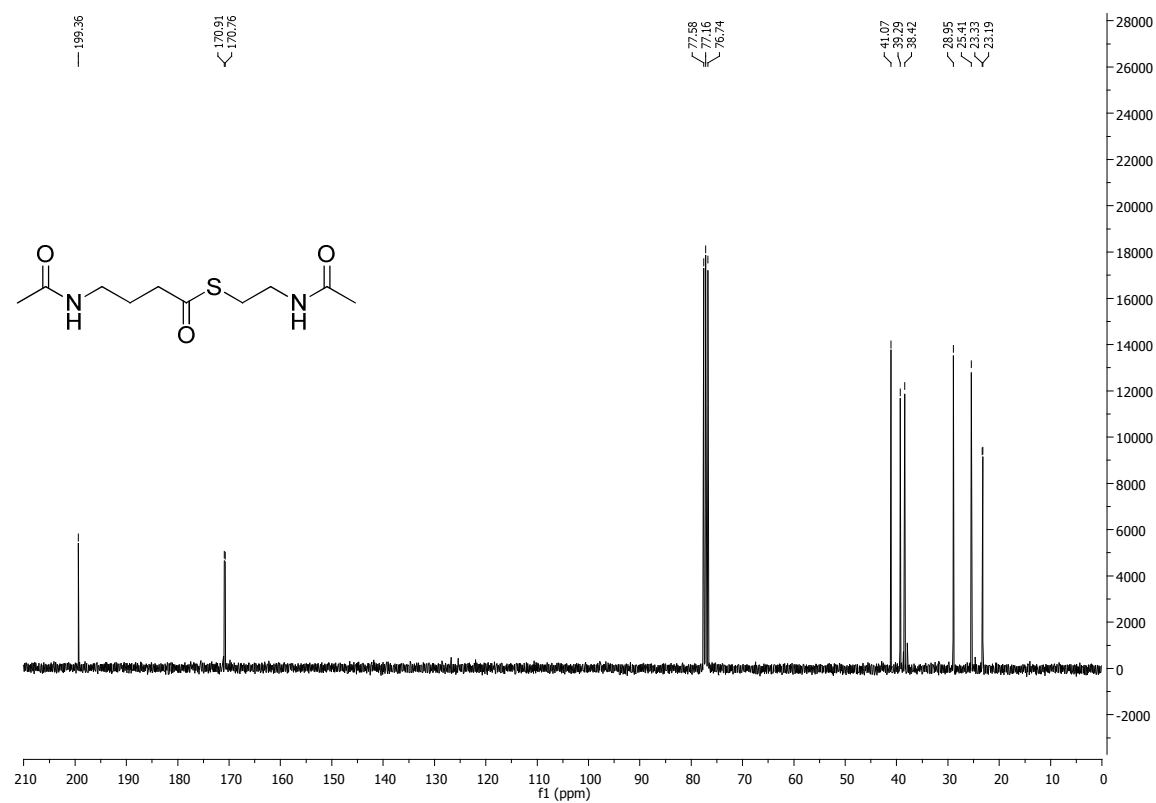
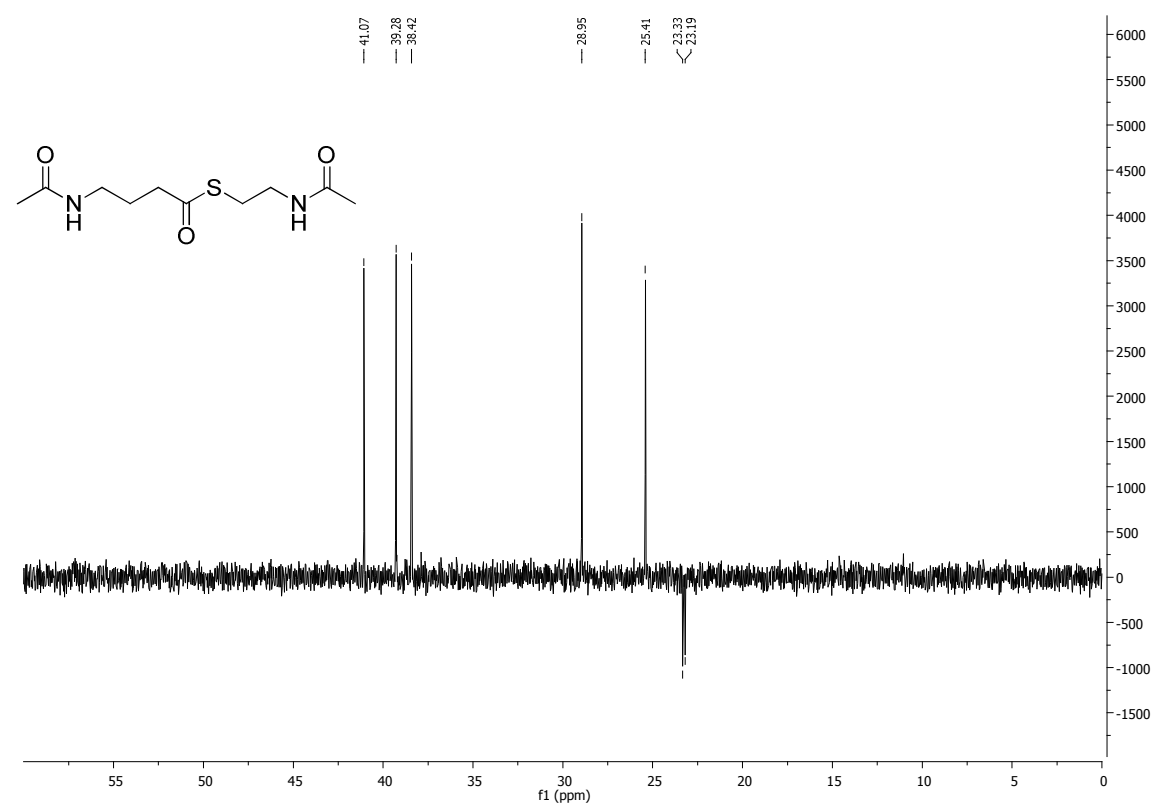
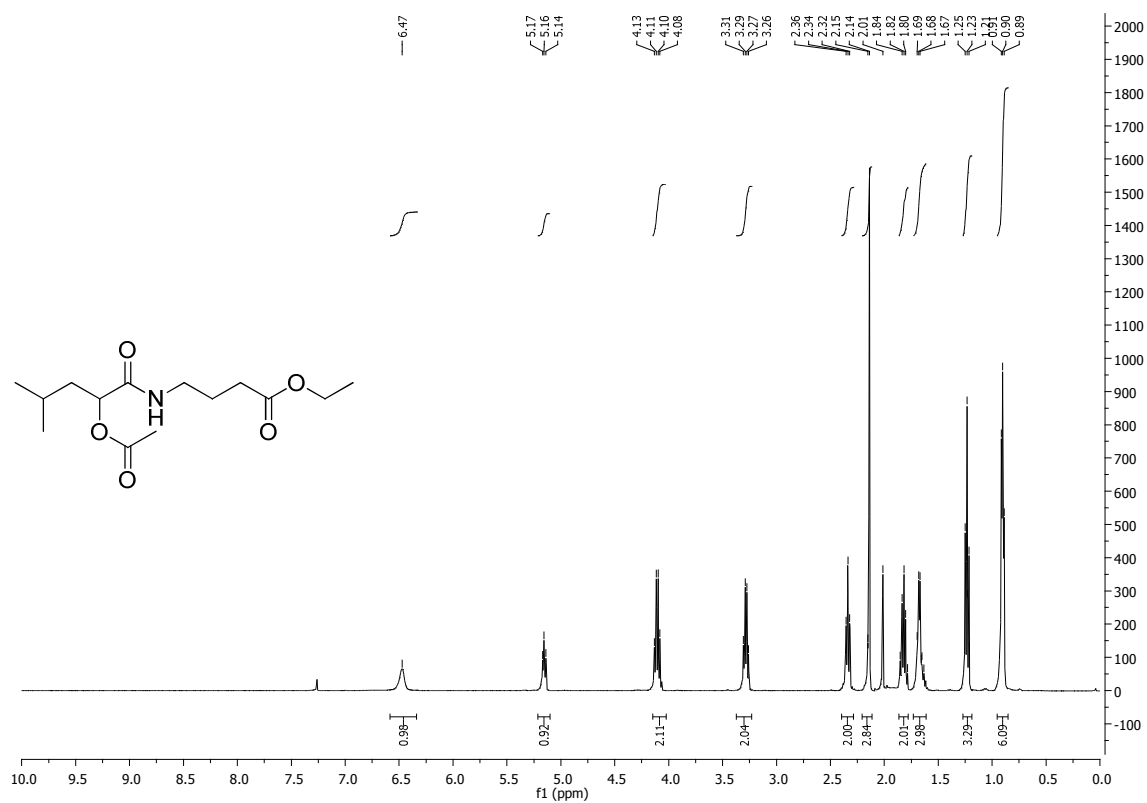
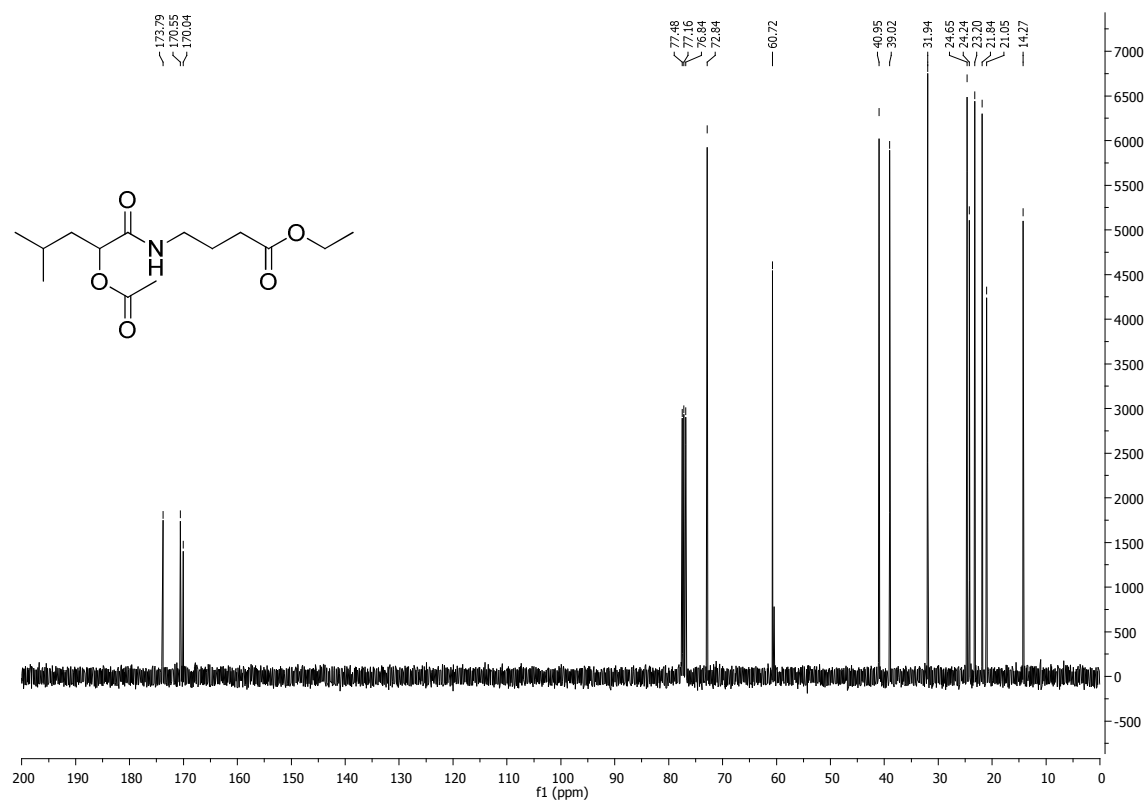
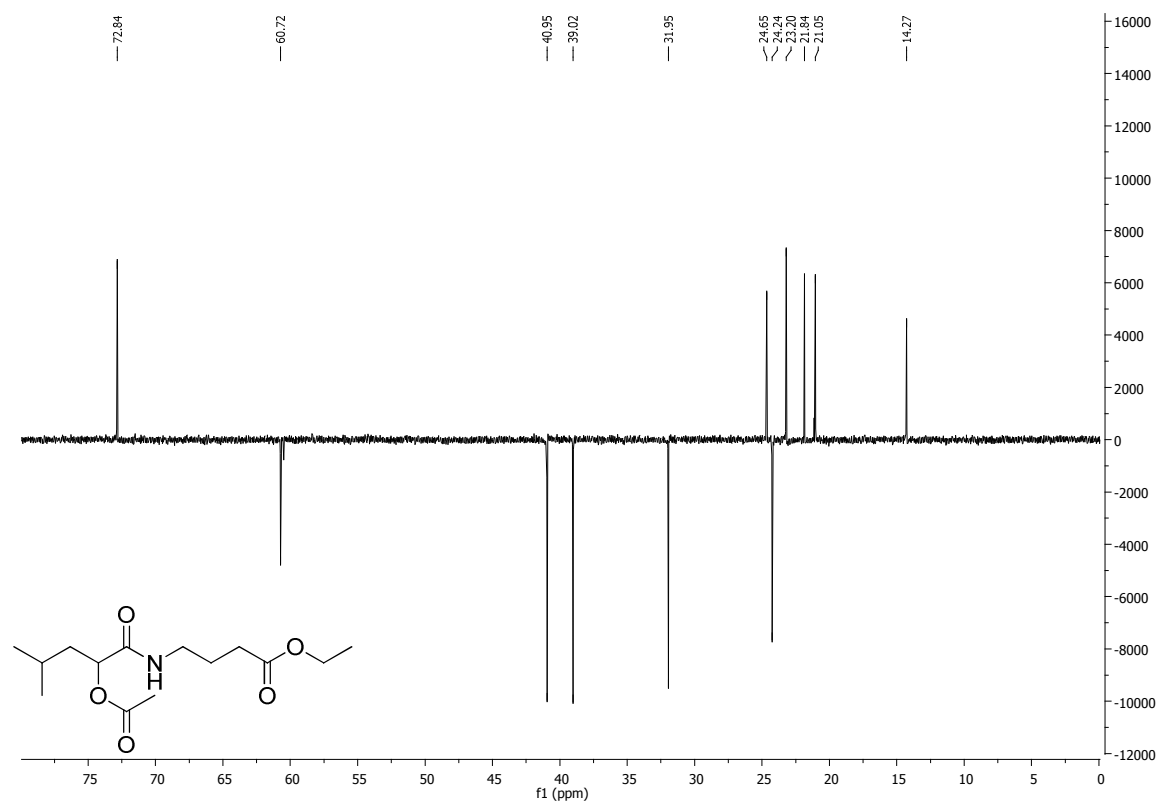
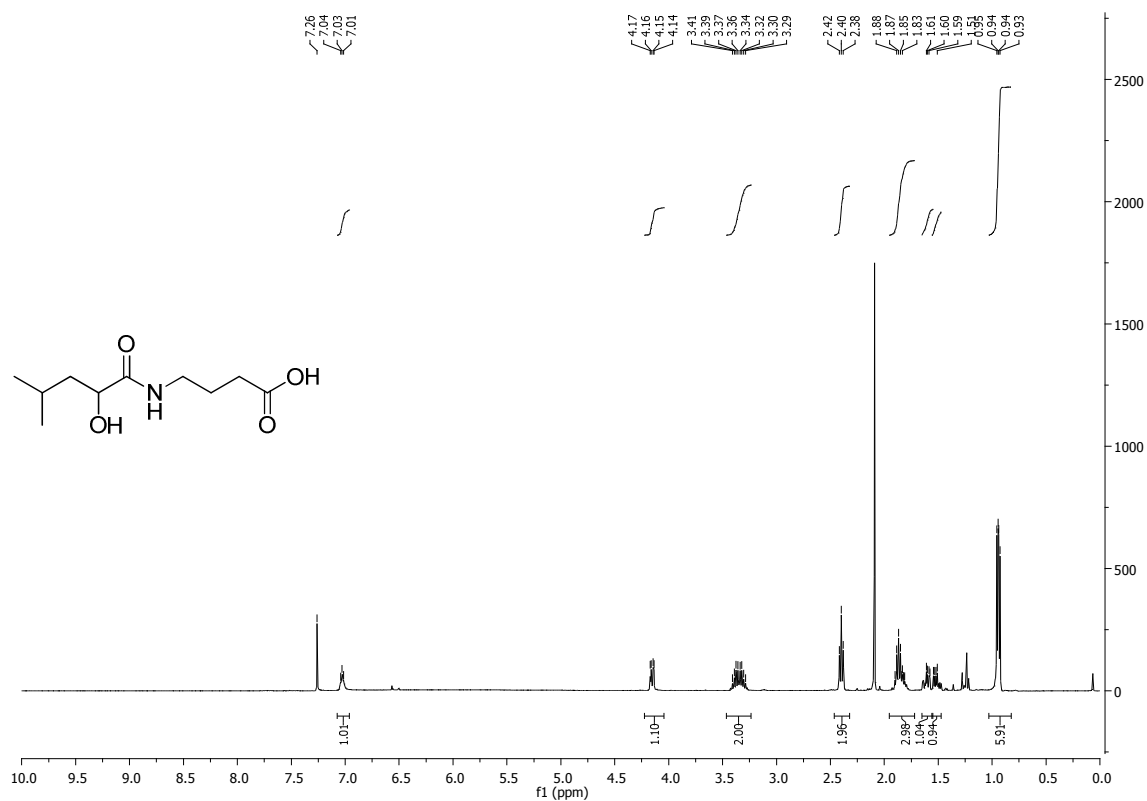


Abbildung 137: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters **67**.

Abbildung 138: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Thioesters **67**.Abbildung 139: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters **68**.

Abbildung 140: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters **68**.Abbildung 141: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Thioesters **68**.

Abbildung 142: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Ethylesters 132a.Abbildung 143: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Ethylesters 132a.

Abbildung 144: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Ethylesters **132a**.Abbildung 145: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure **132b**.

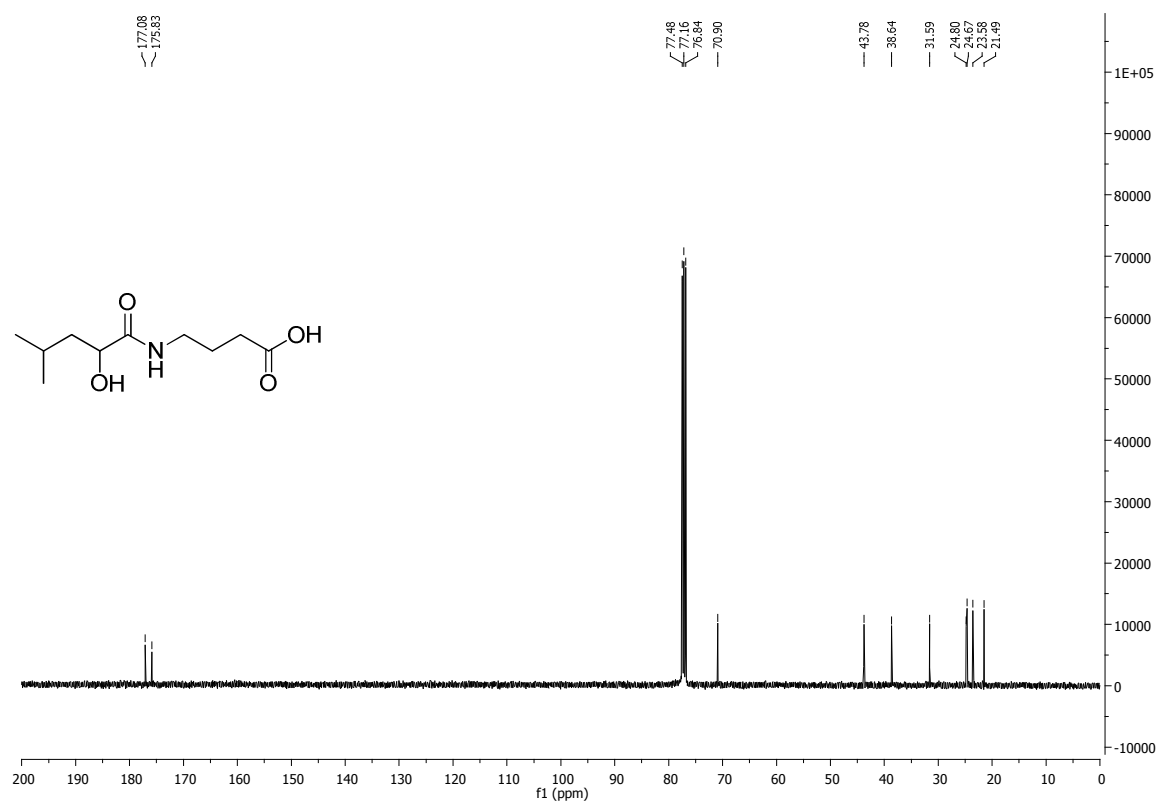


Abbildung 146: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) der Säure 132b.

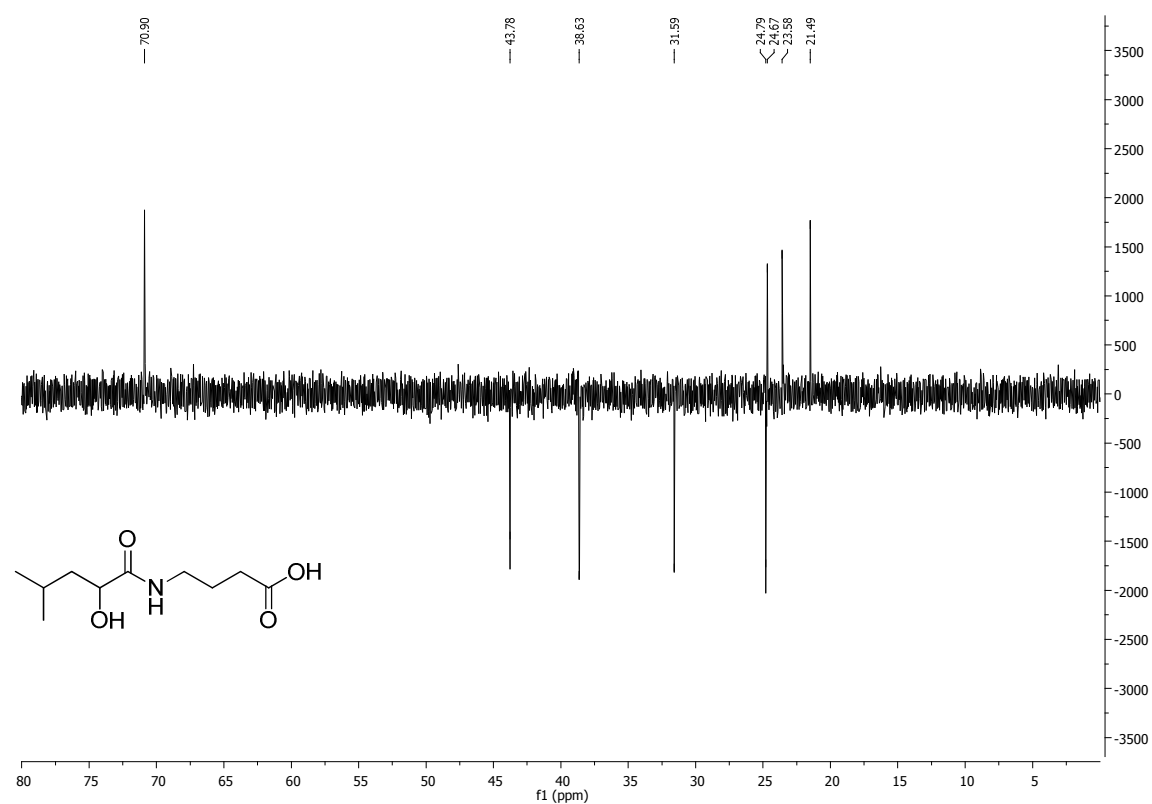
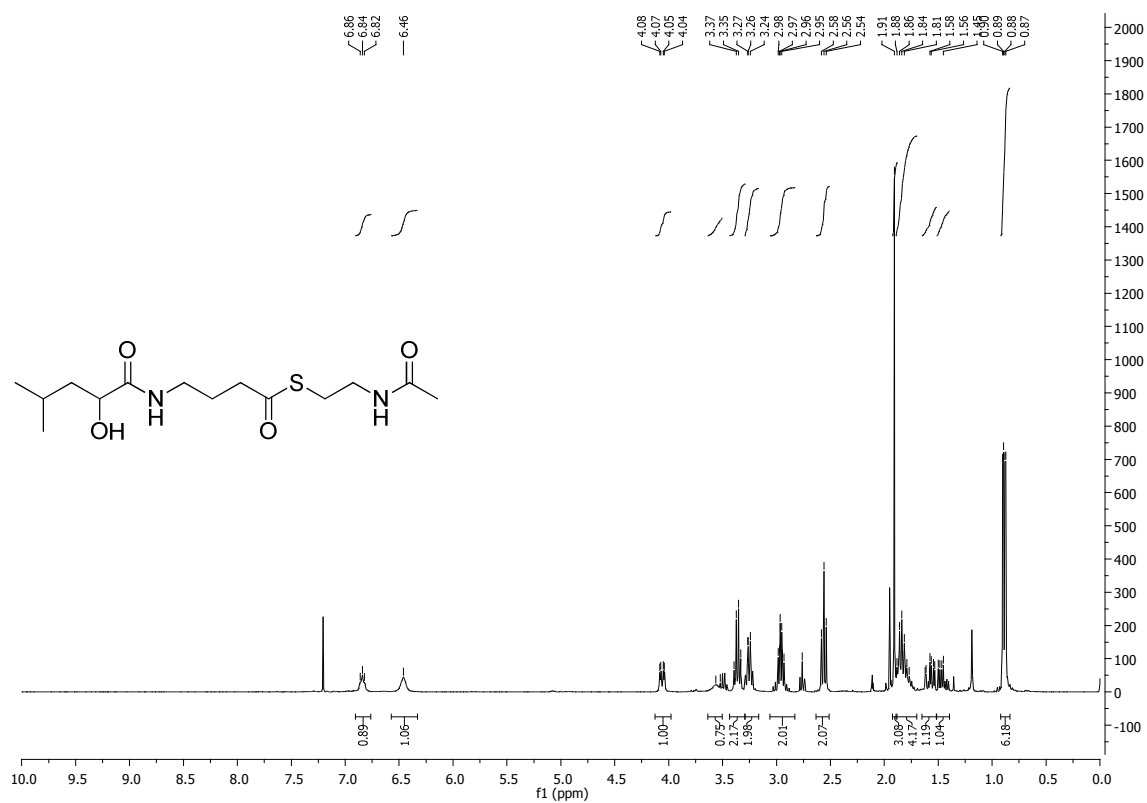
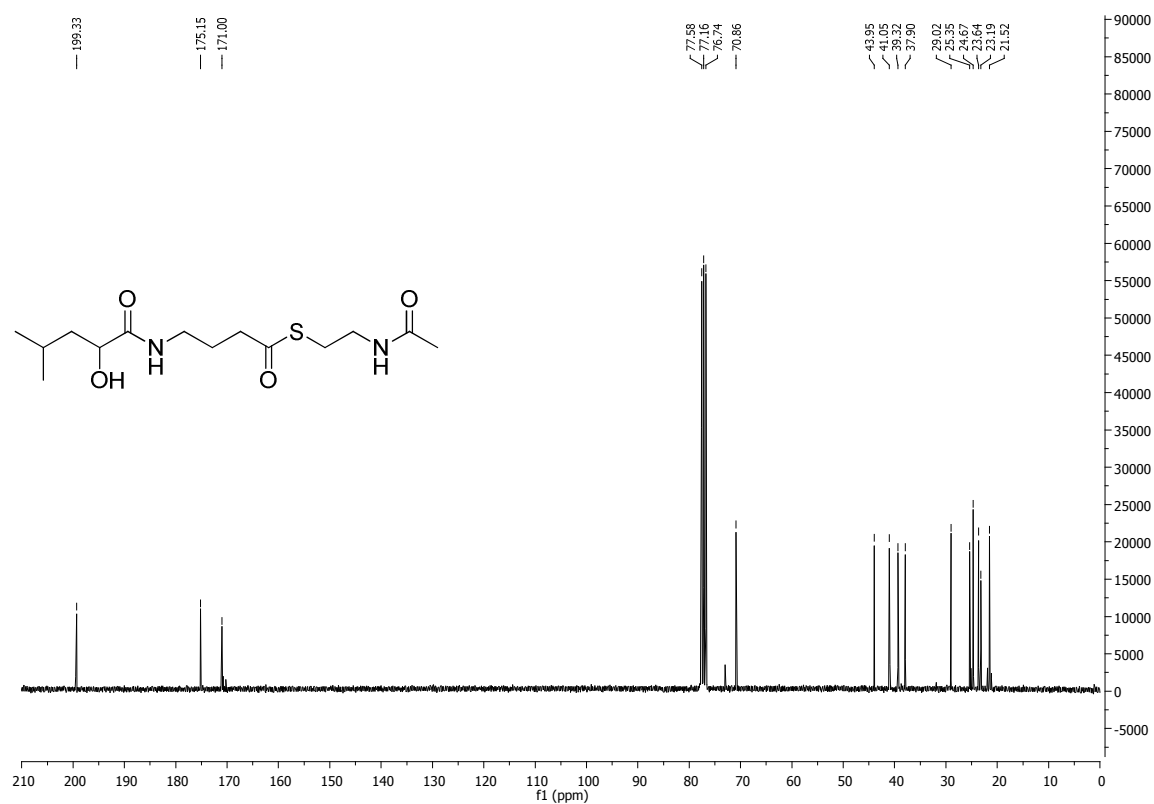


Abbildung 147: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) der Säure 132b.

Abbildung 148: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 72.Abbildung 149: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 72.

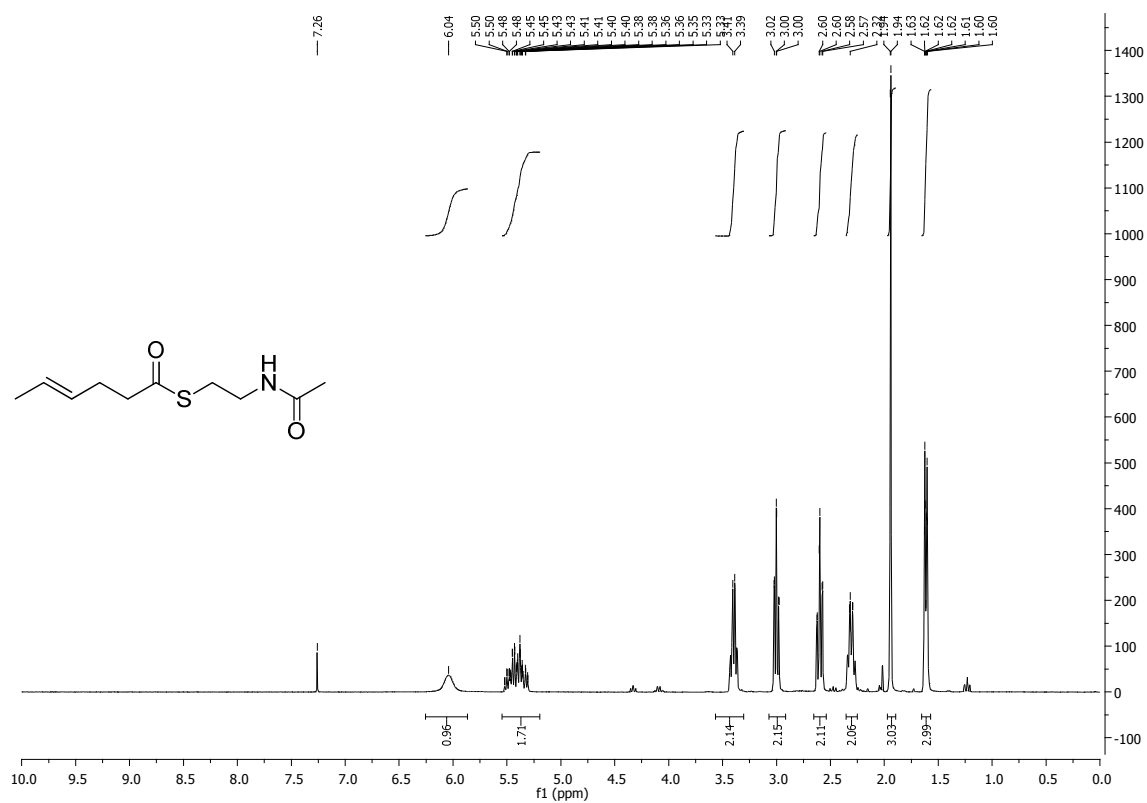


Abbildung 150: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters **73**.

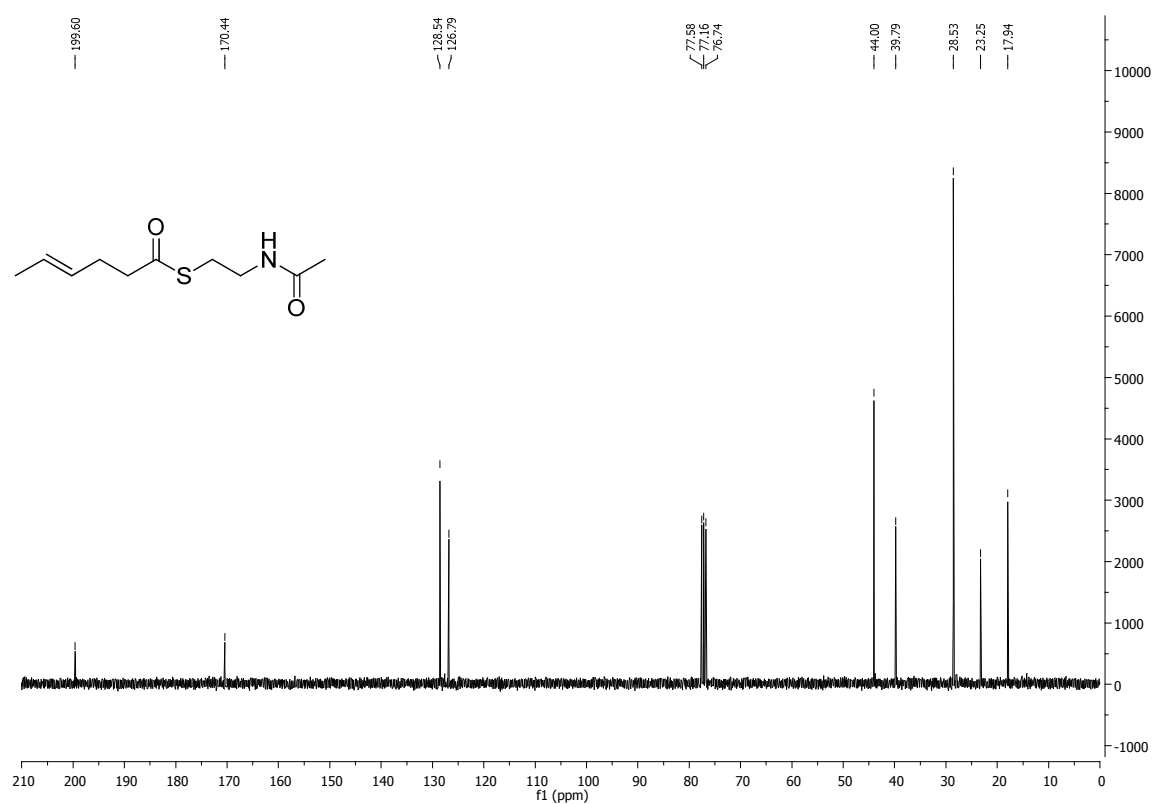
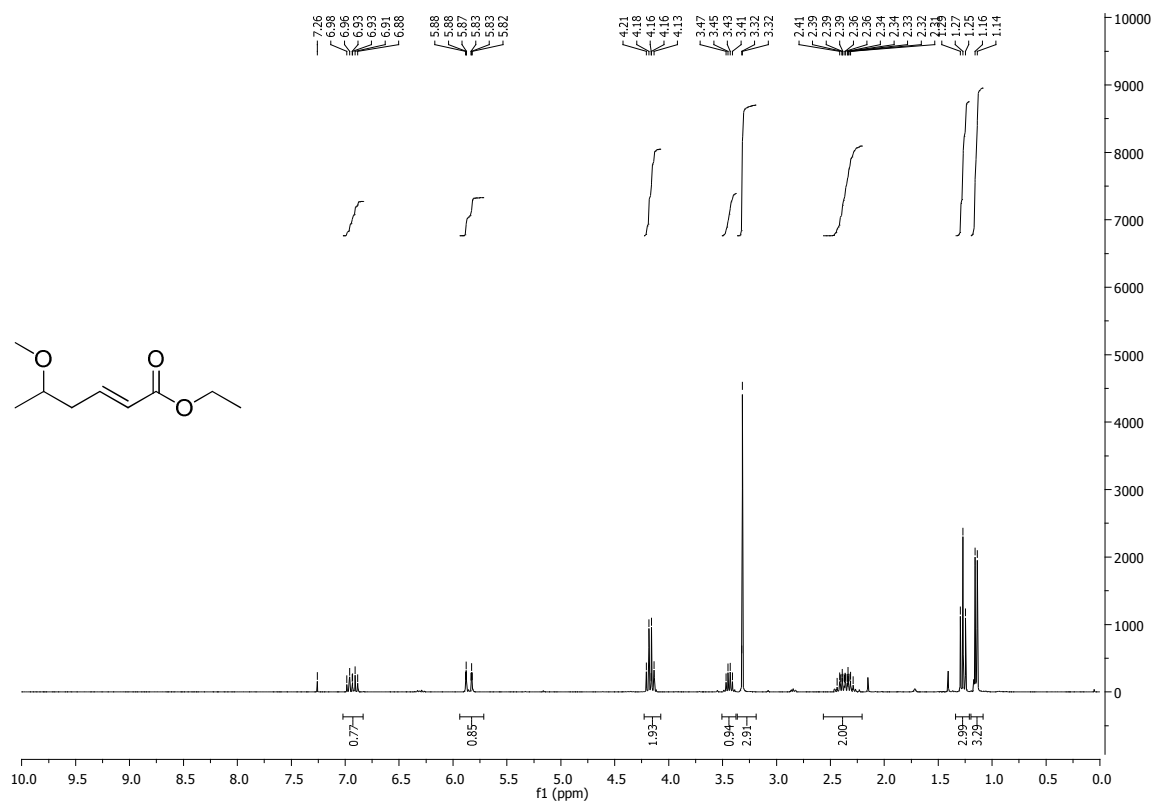
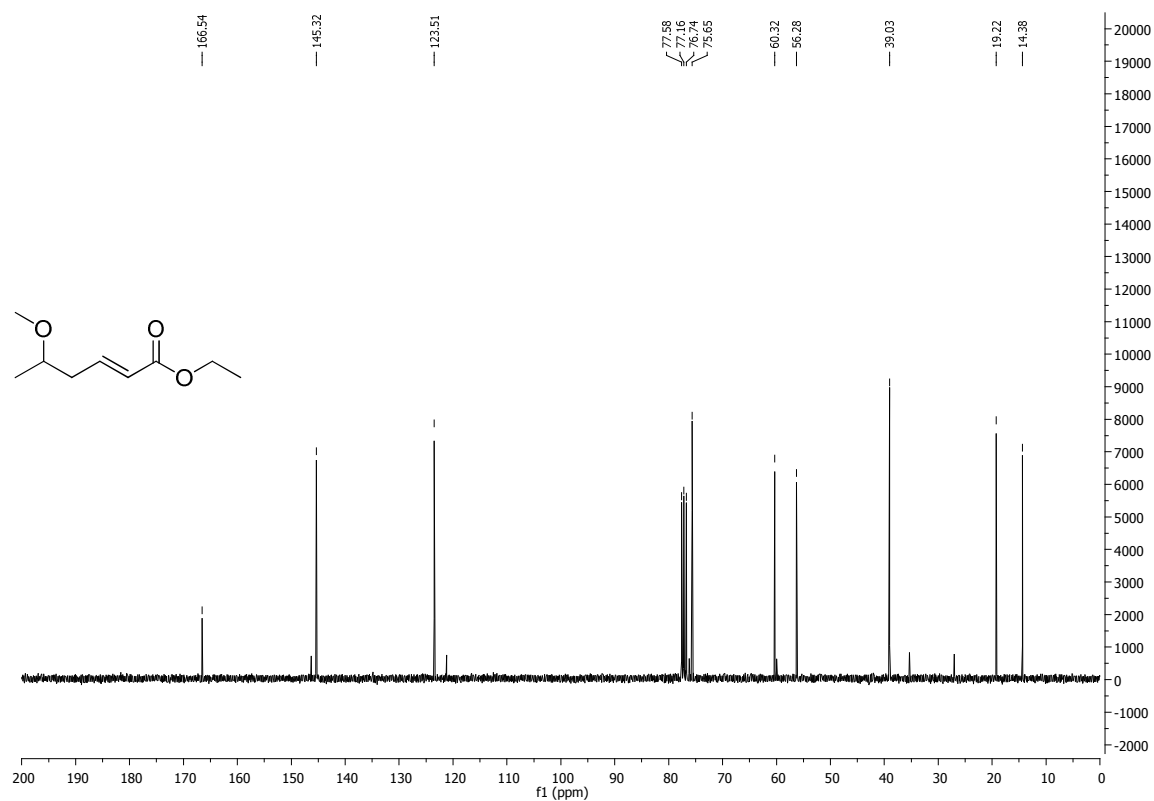


Abbildung 151: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters **73**.

Abbildung 152: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Ethylesters 144.Abbildung 153: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Ethylesters 144.

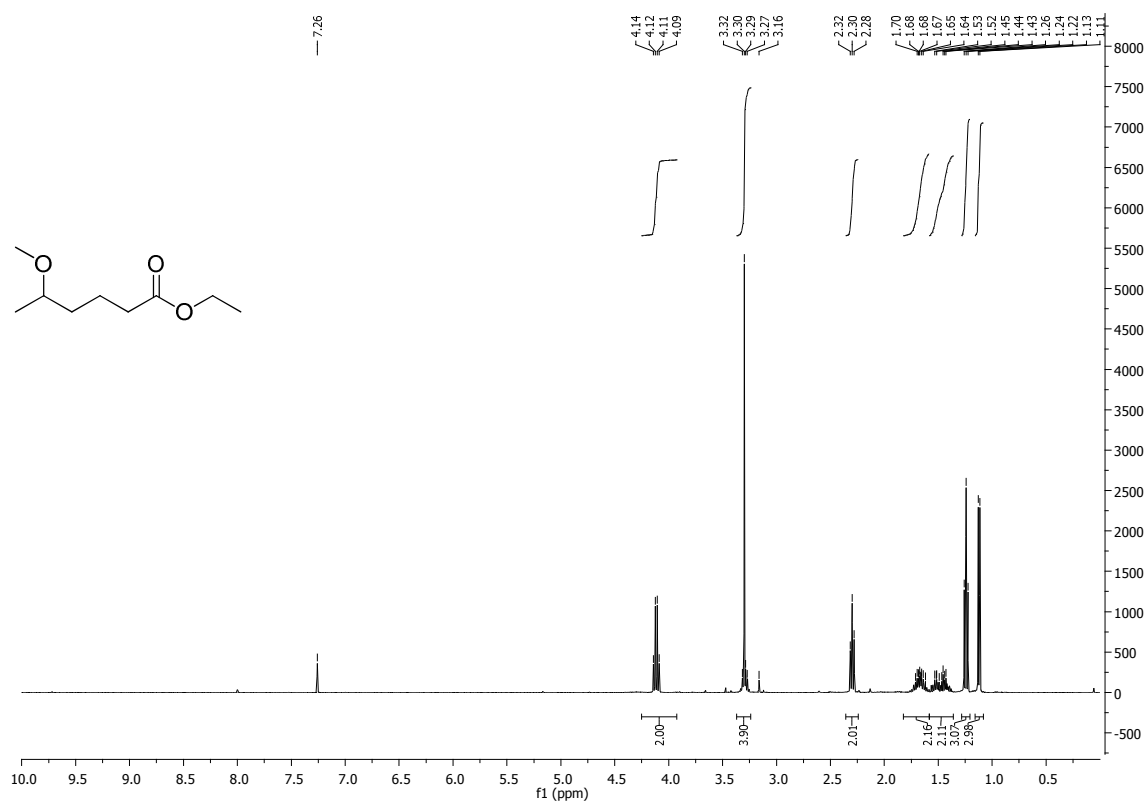


Abbildung 154: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Ethylesters 145a.

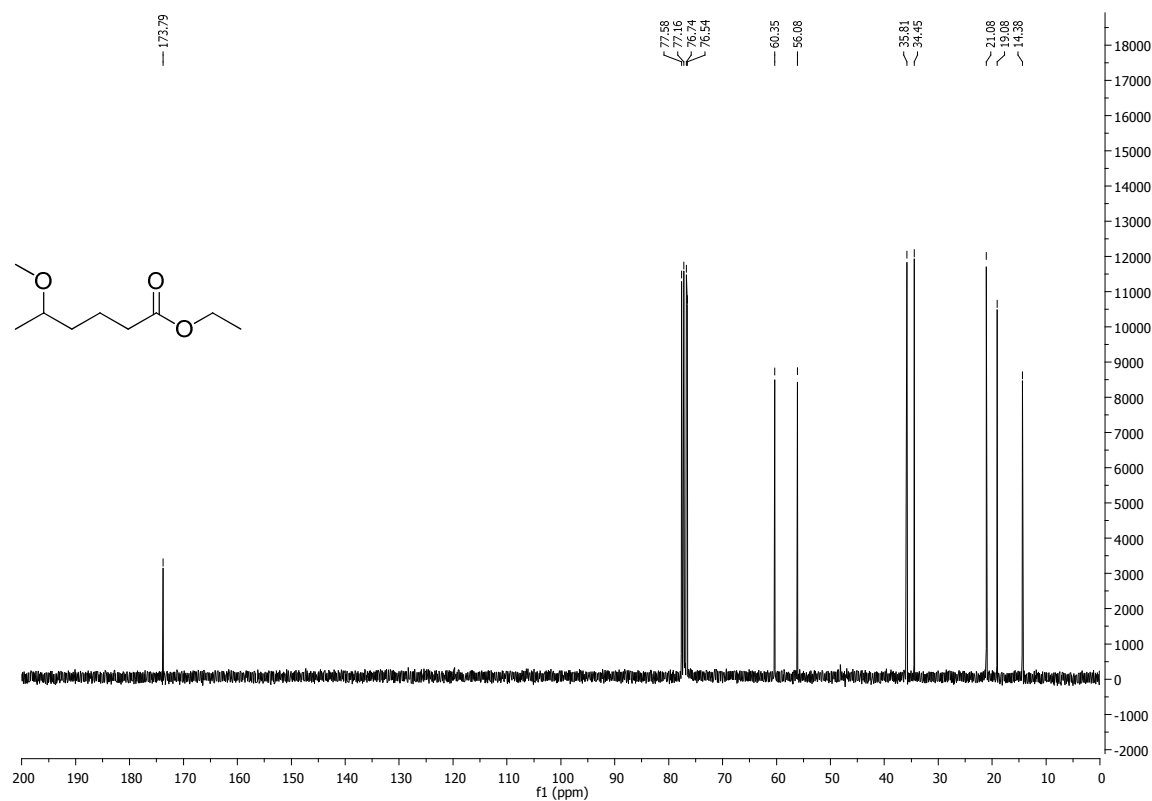
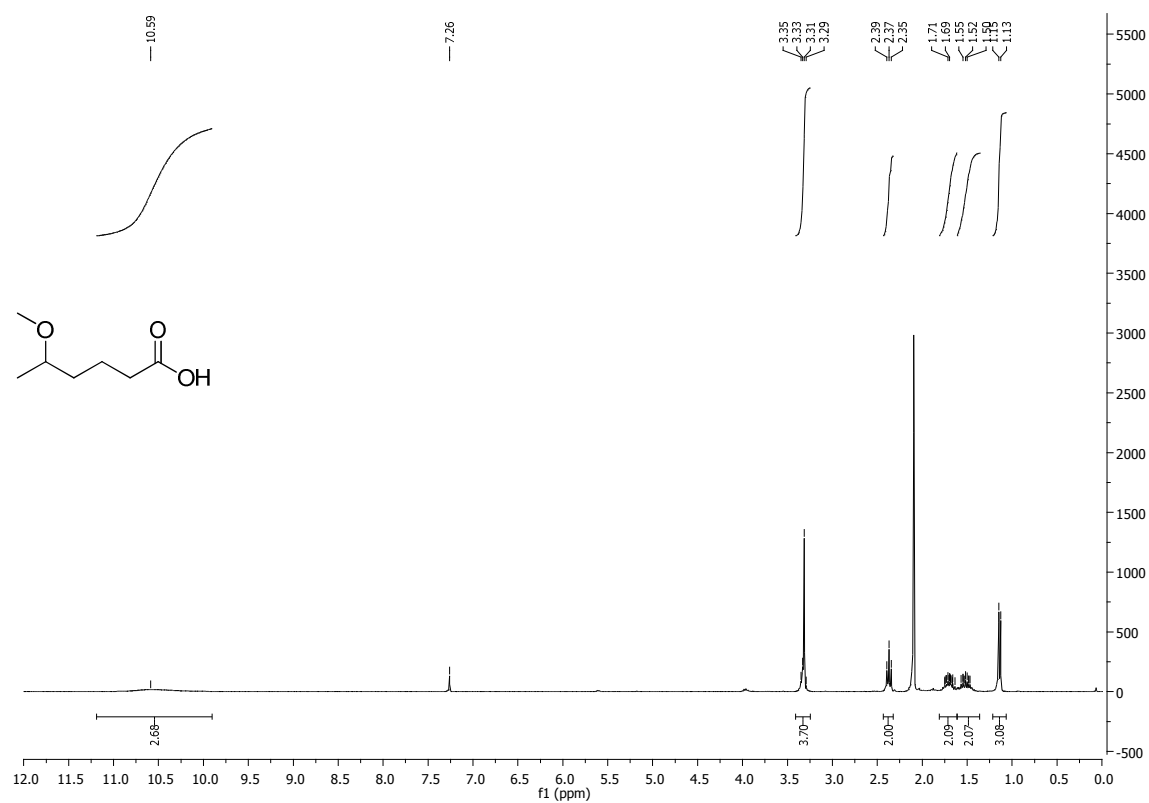
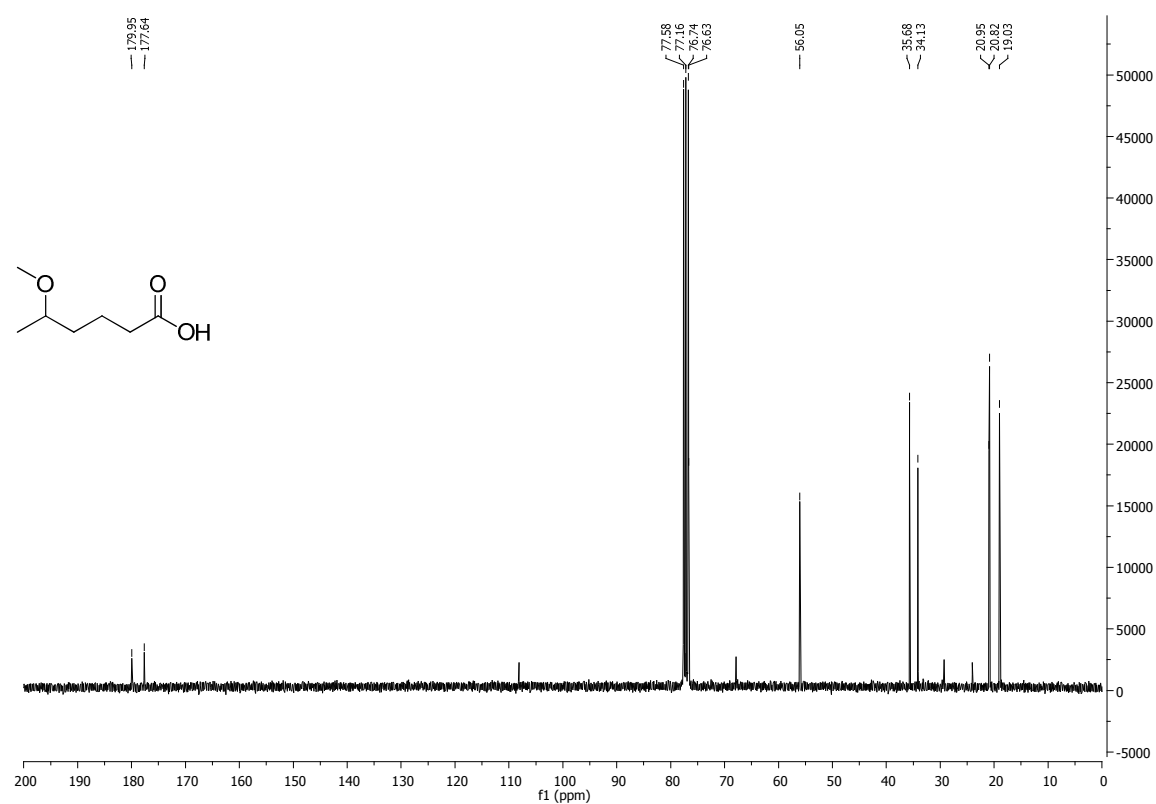


Abbildung 155: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Ethylesters 145a.

Abbildung 156: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure 145b.Abbildung 157: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) der Säure 145b.

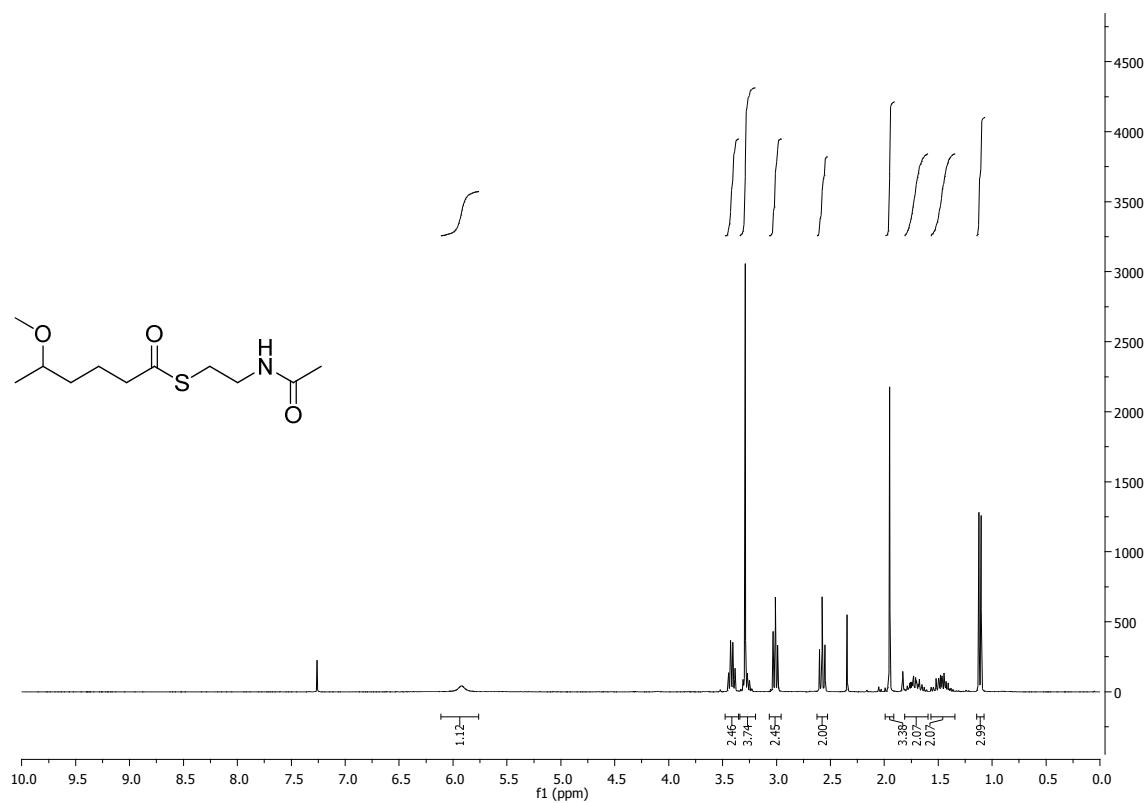


Abbildung 158: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters **74**.

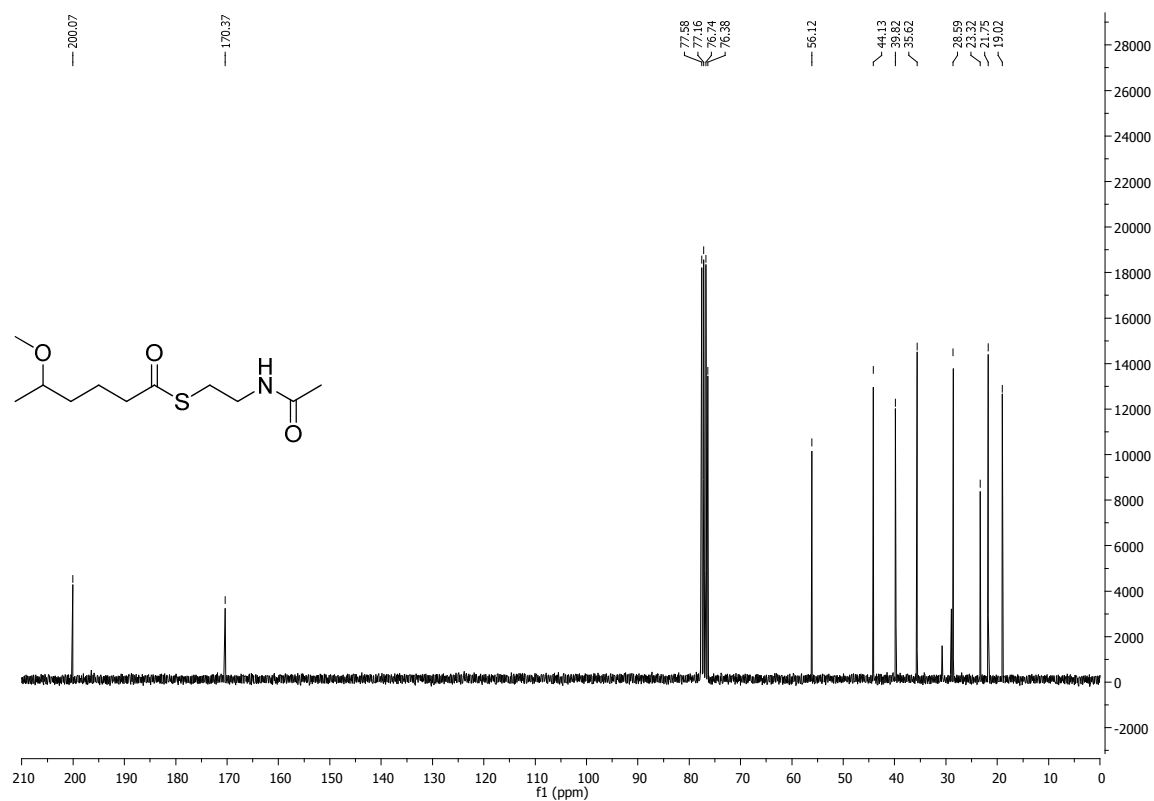
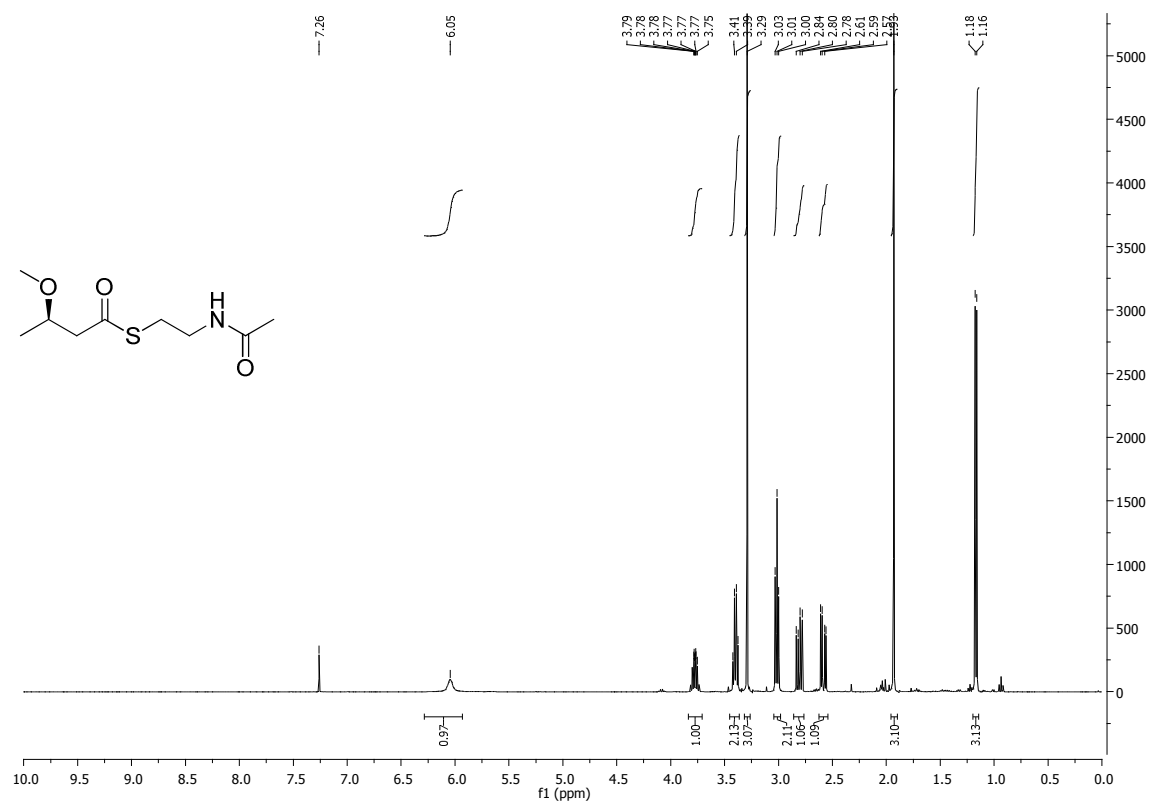
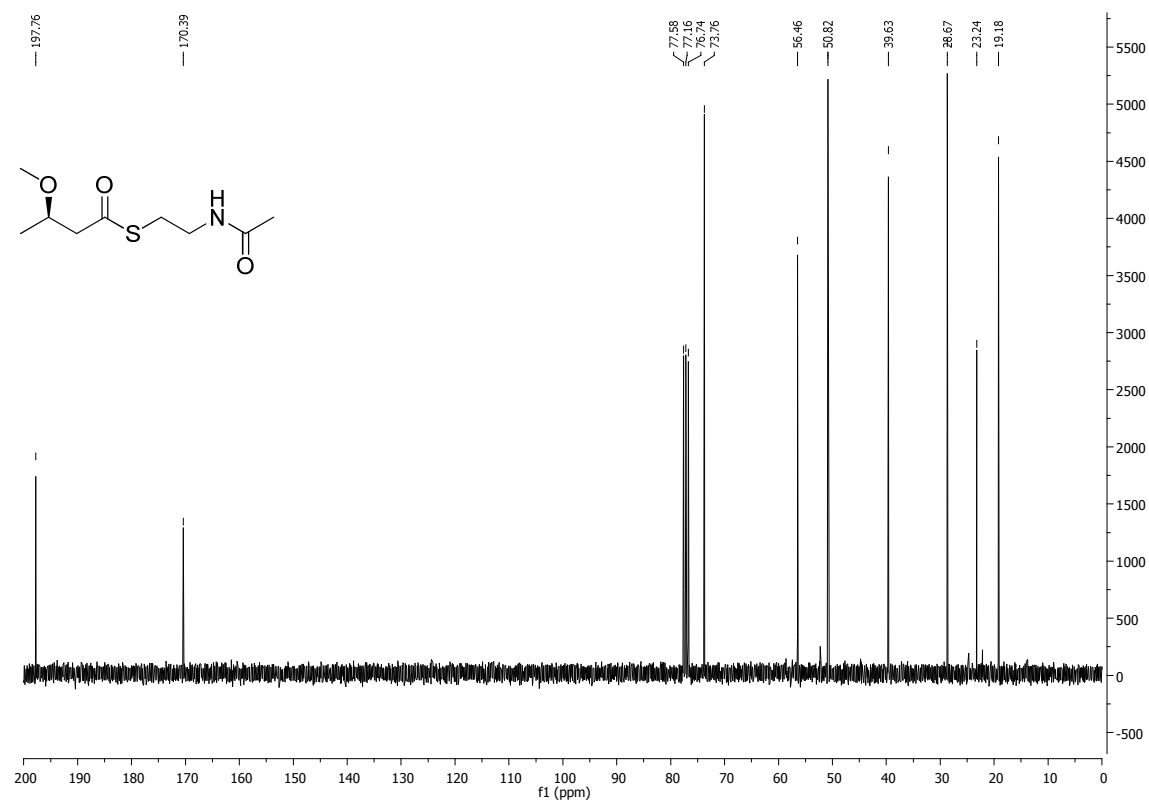
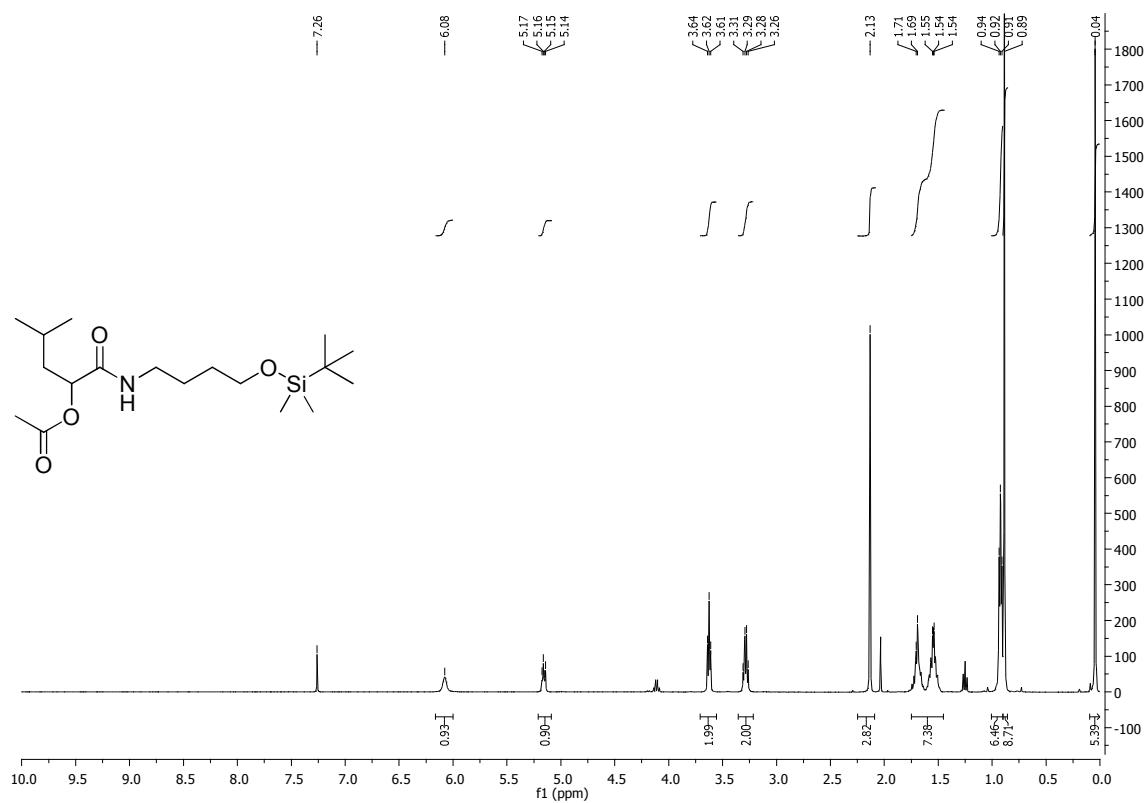
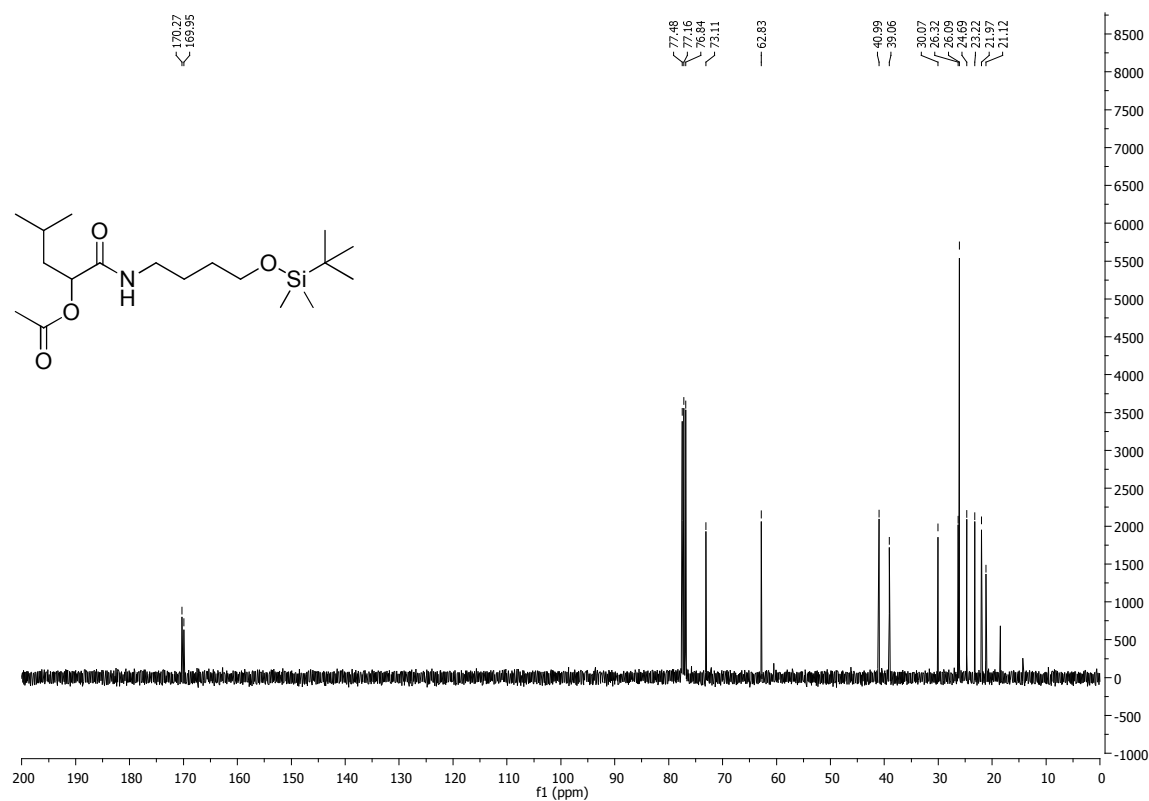
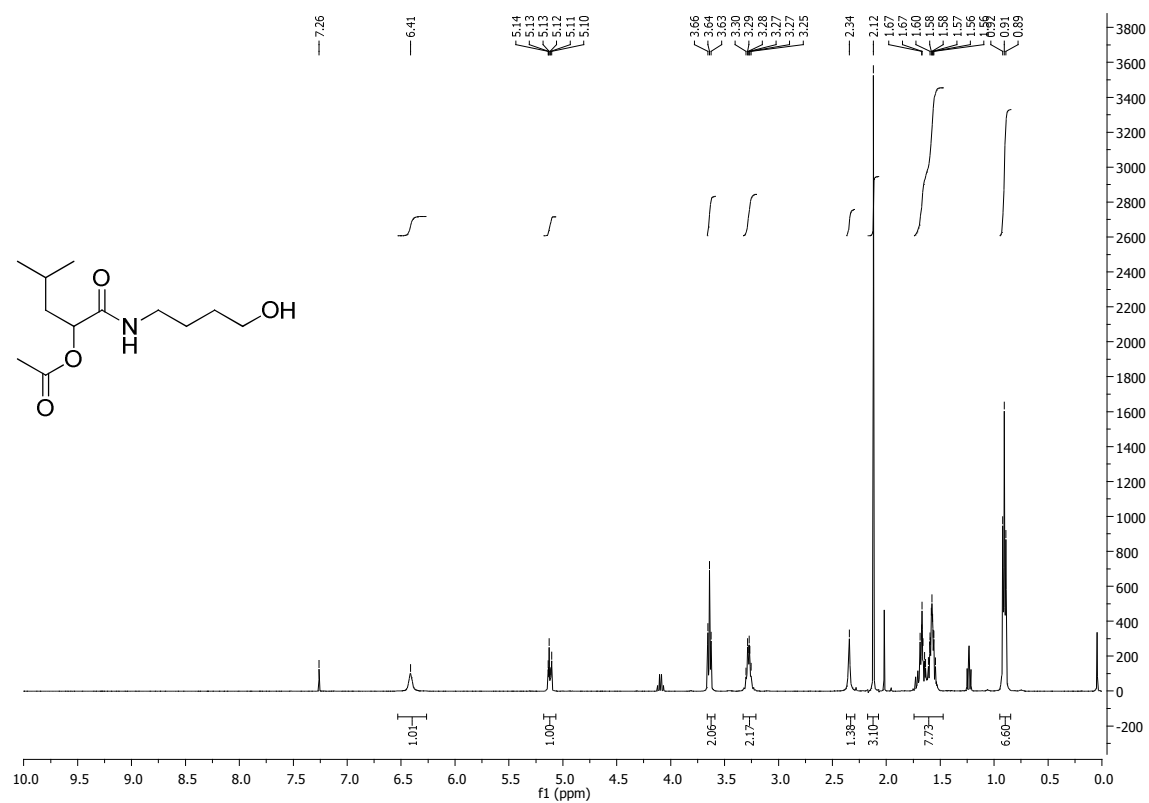
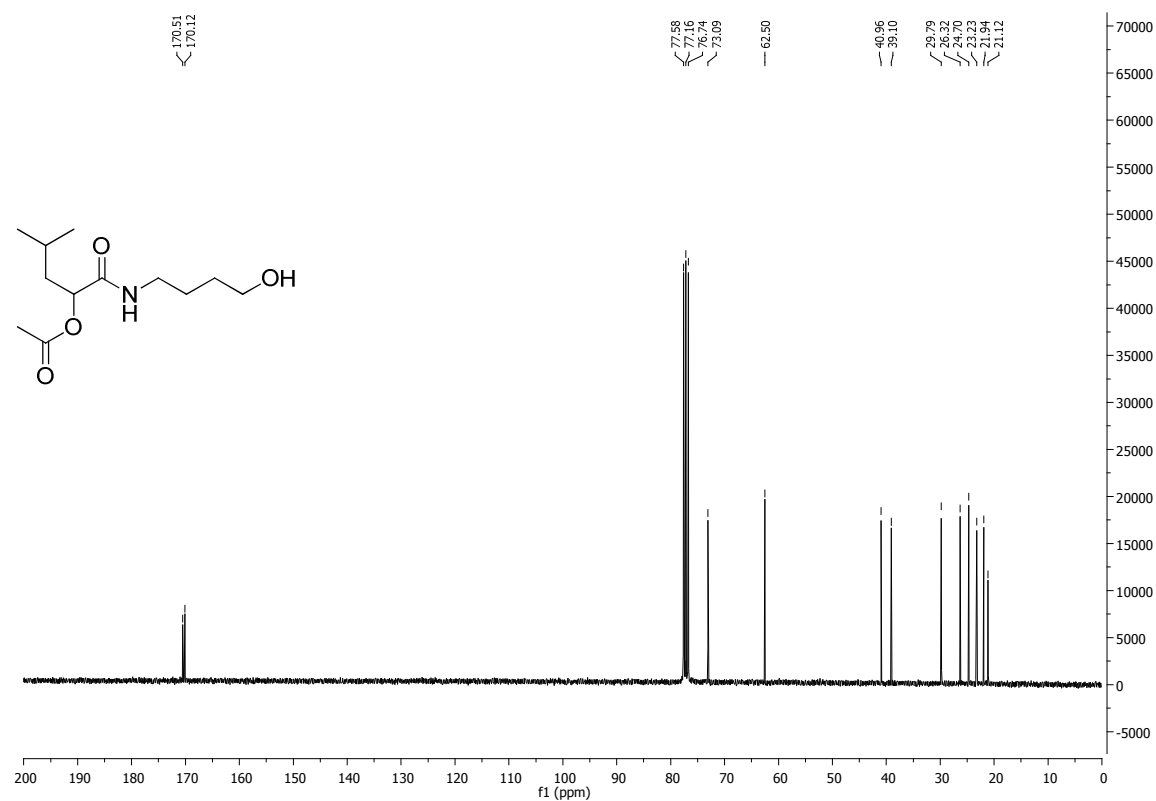
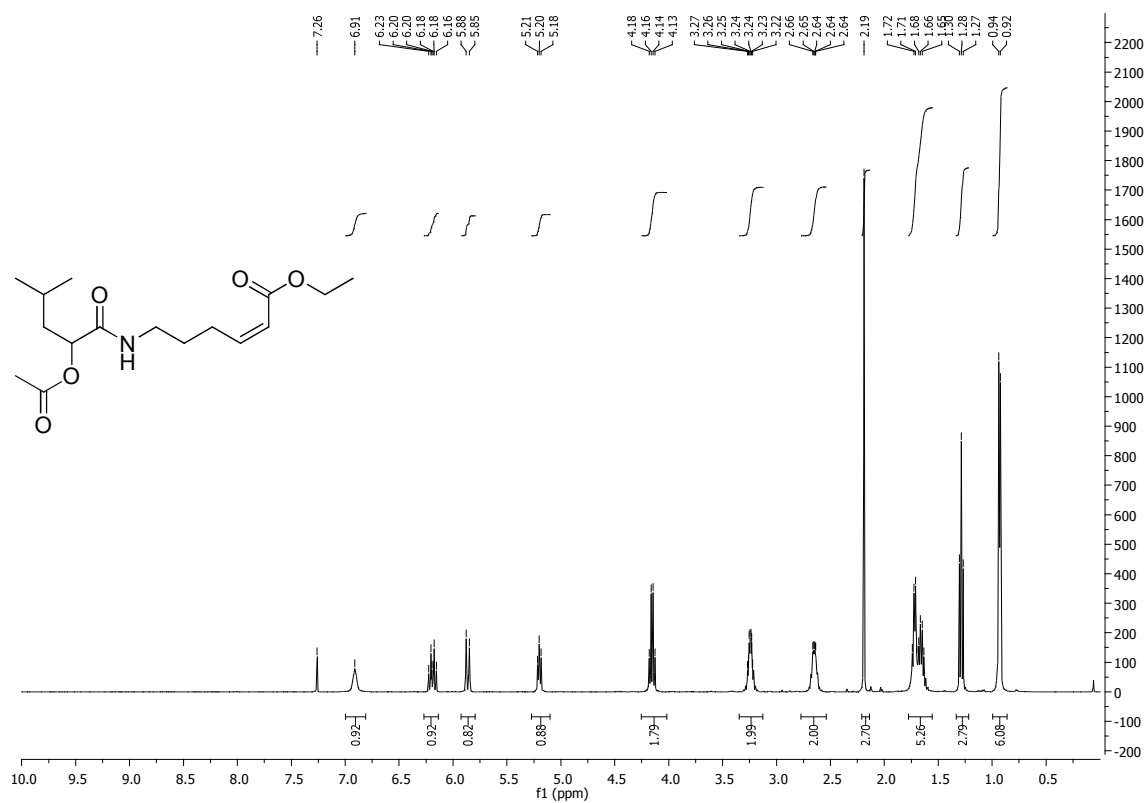
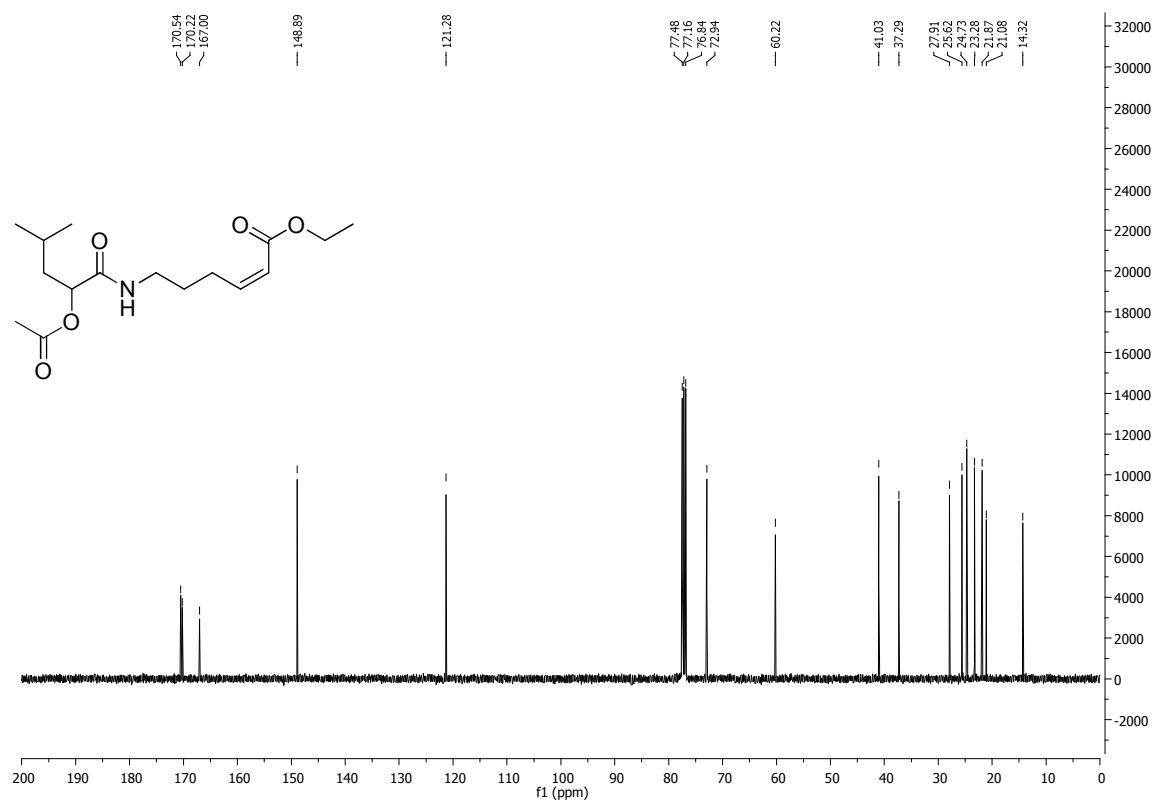


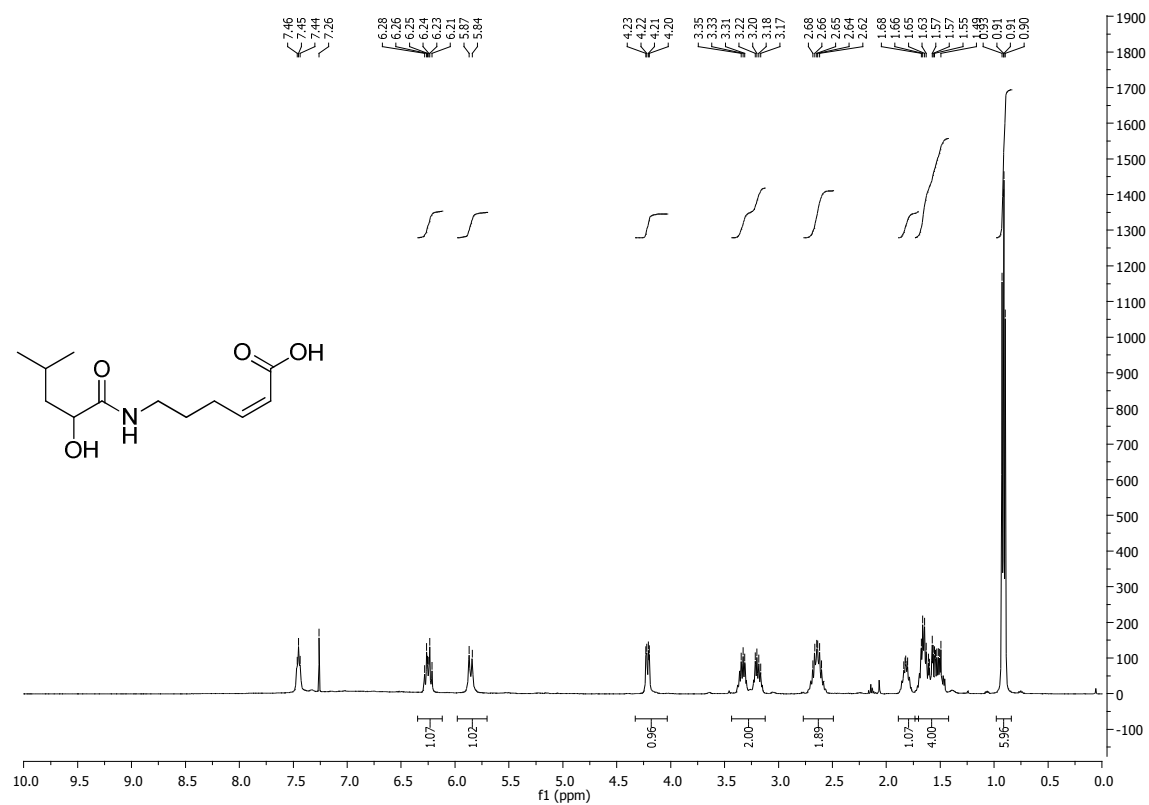
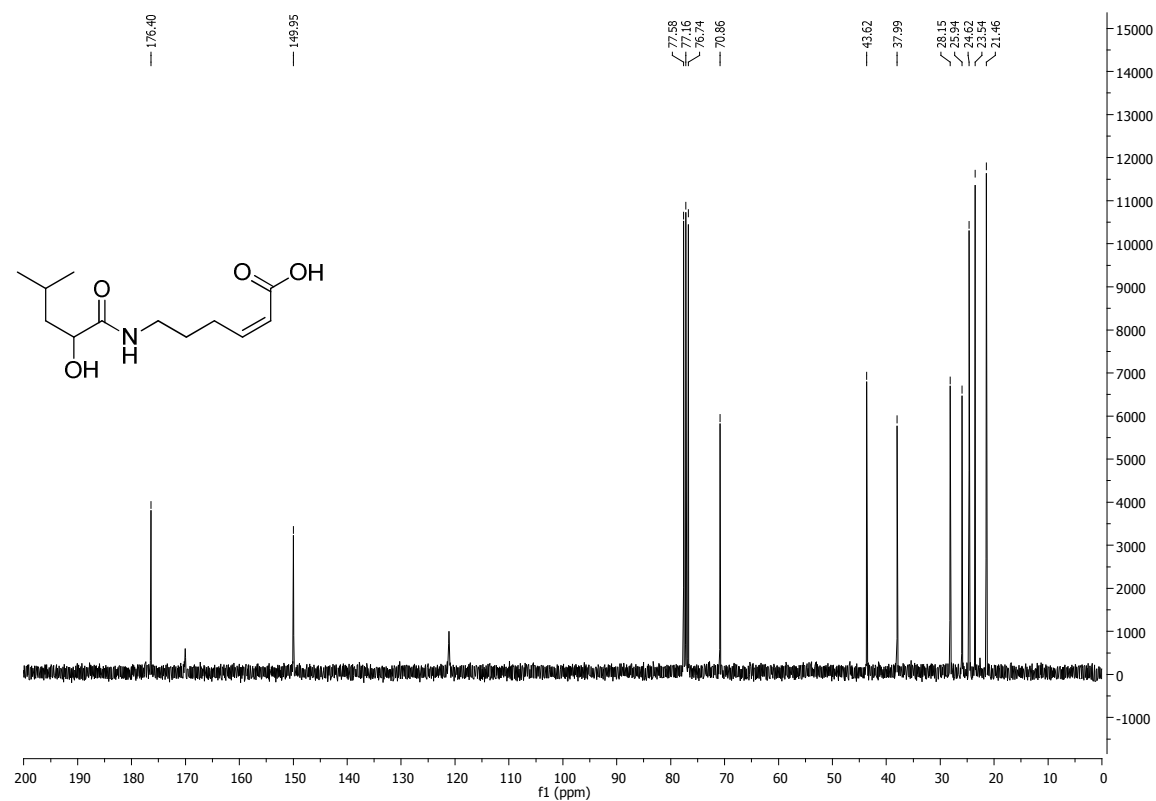
Abbildung 159: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters **74**.

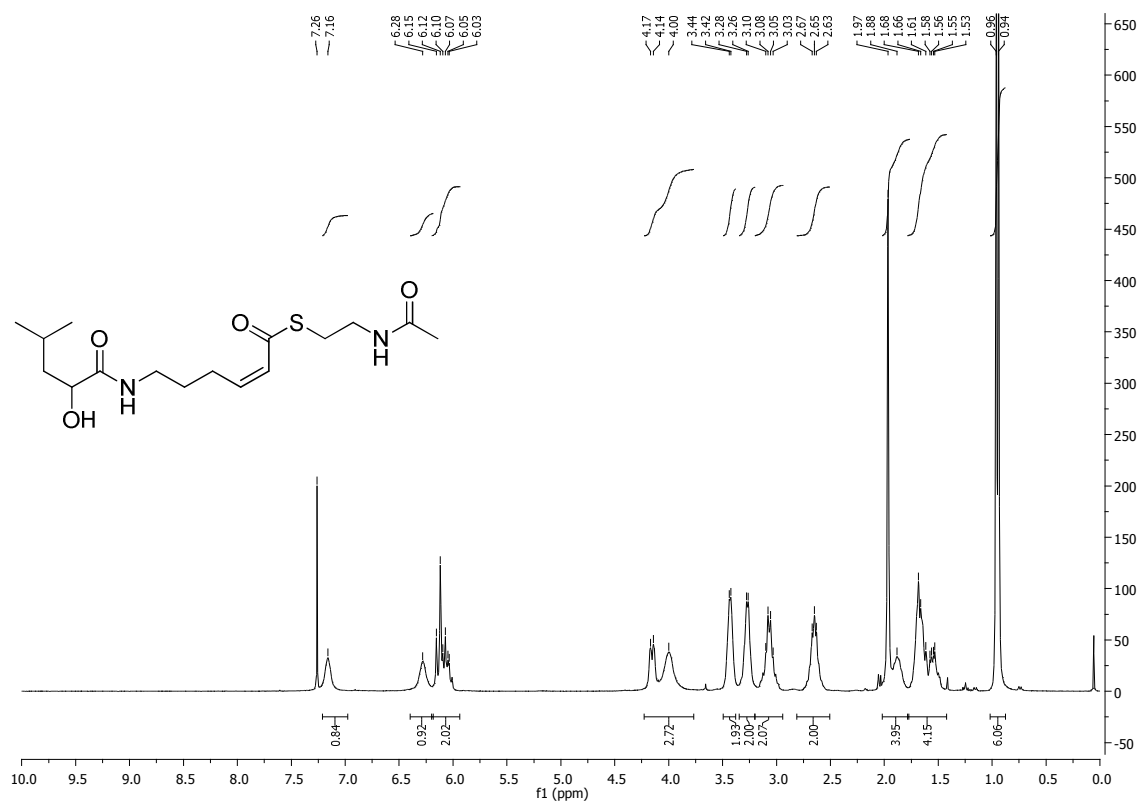
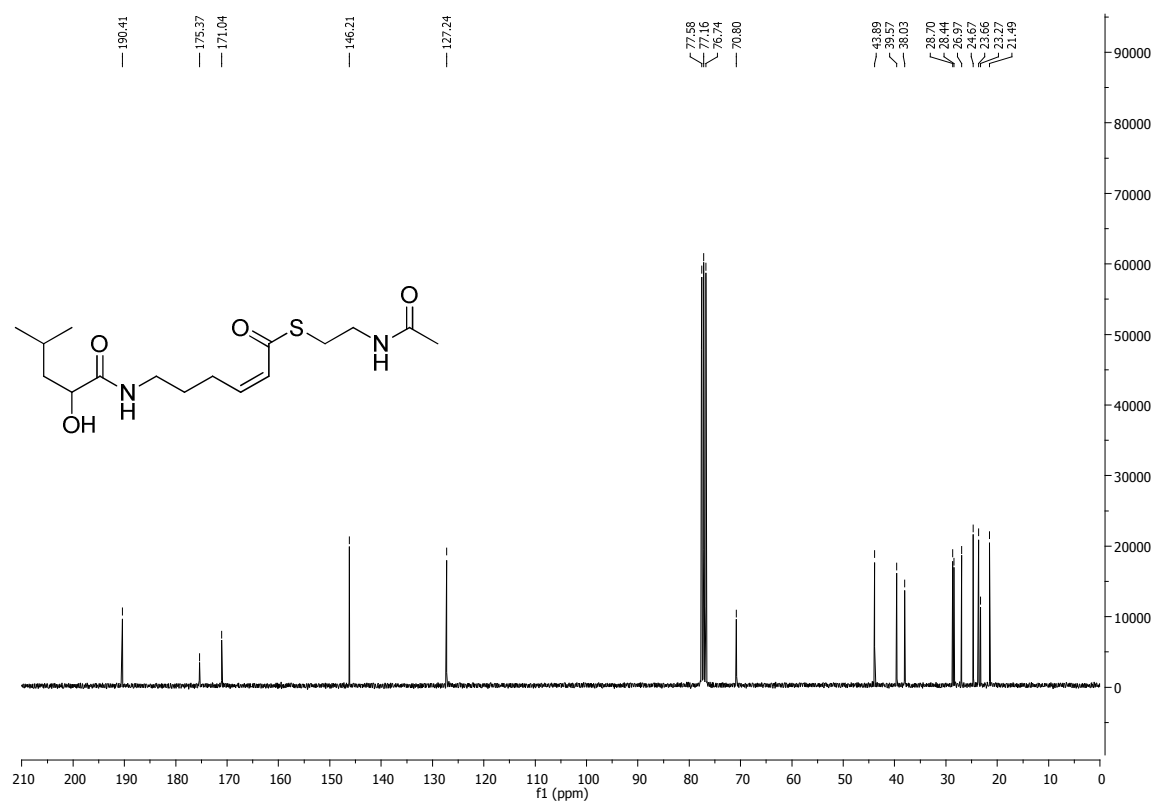
Abbildung 160: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 75.Abbildung 161: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 75.

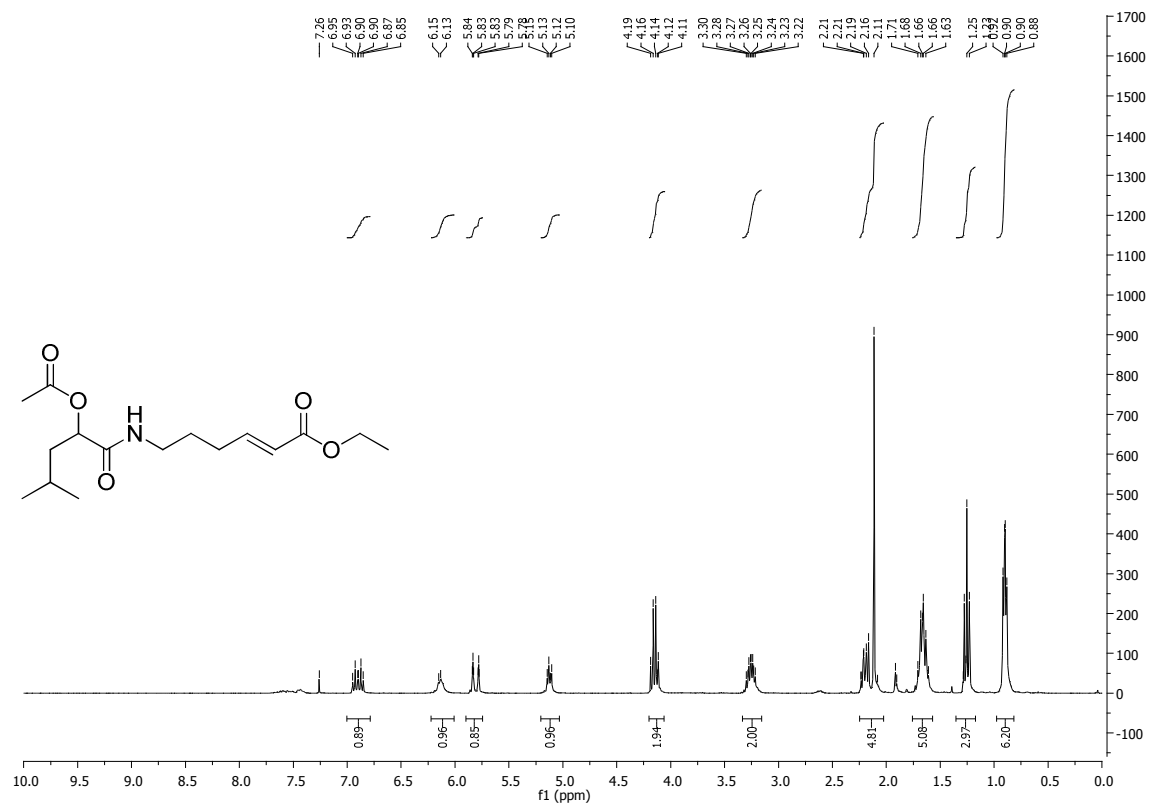
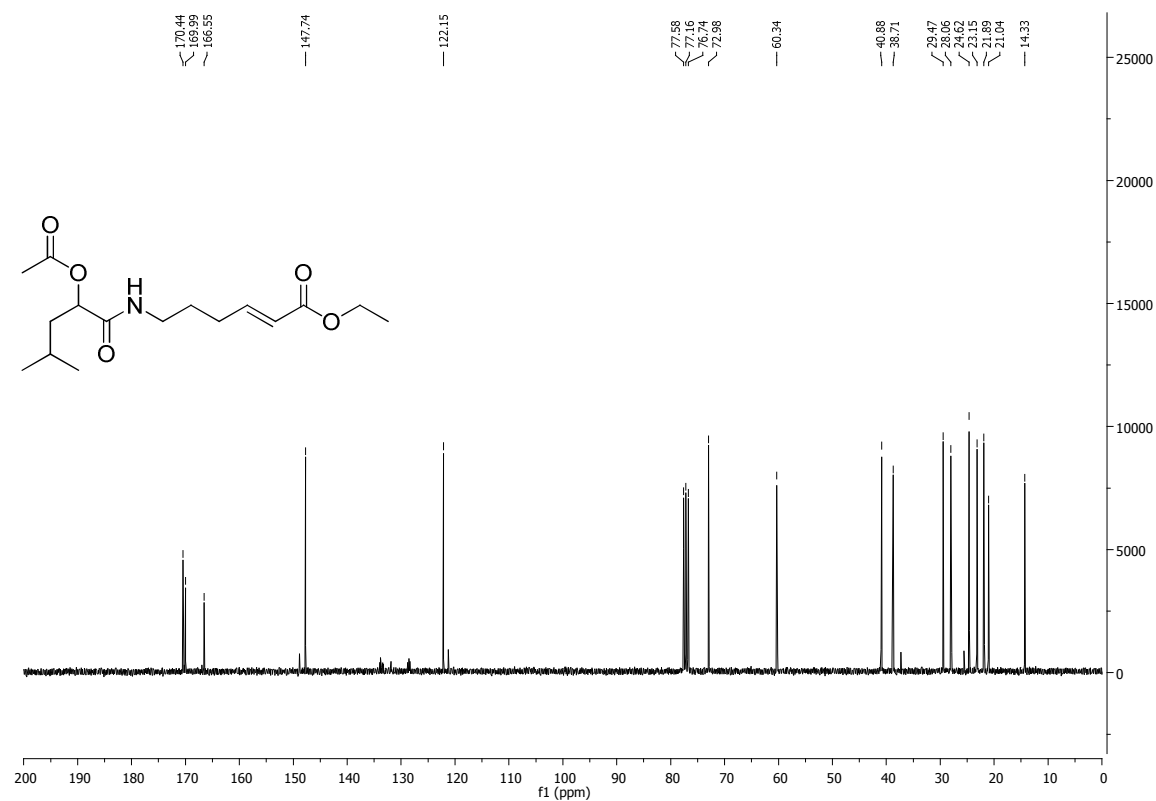
Abbildung 162: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Amids **82a**.Abbildung 163: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Amids **82a**.

Abbildung 164: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Alkohols **82b**.Abbildung 165: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Alkohols **82b**.

Abbildung 166: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Ethylesters **84a**.Abbildung 167: ¹³C-NMR-Spektrum (100 MHz) des Ethylesters **84a**.

Abbildung 168: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure 84b.Abbildung 169: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) der Säure 84b.

Abbildung 170: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters **76**.Abbildung 171: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters **76**.

Abbildung 172: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Esters **156a**.Abbildung 173: ¹³C-NMR-Spektrum (100 MHz) des Esters **156a**.

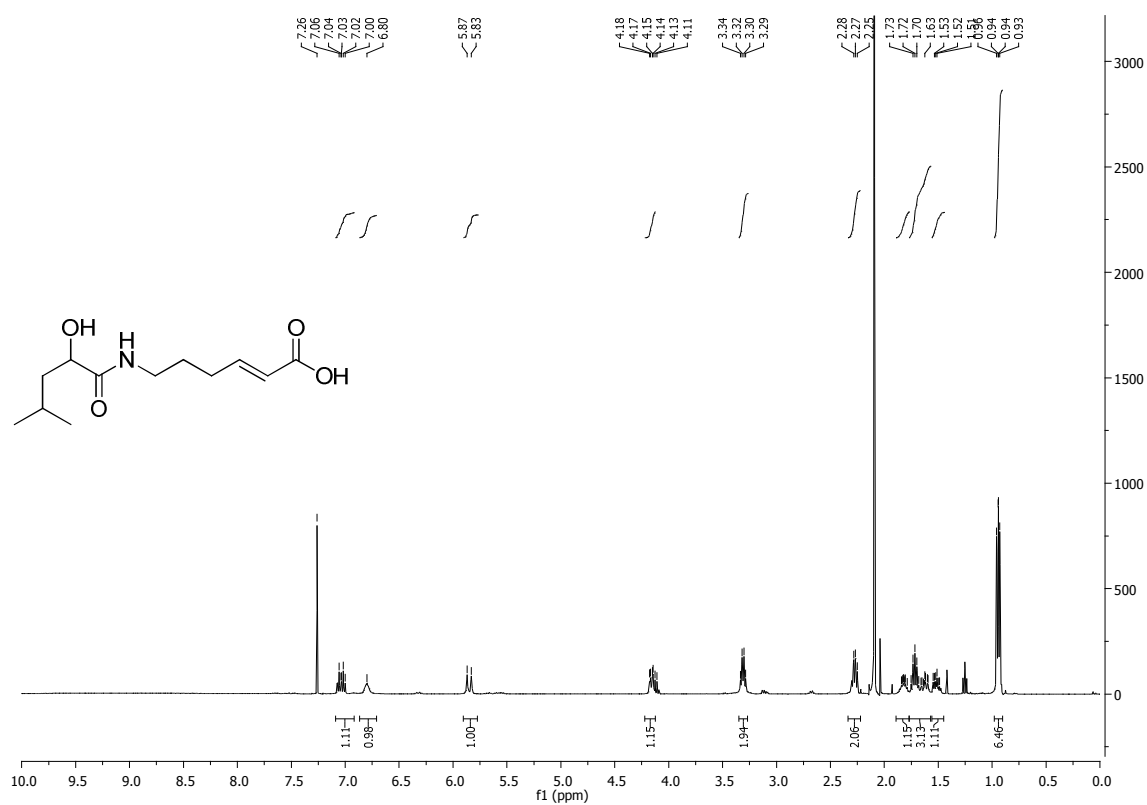


Abbildung 174: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure **156b**.

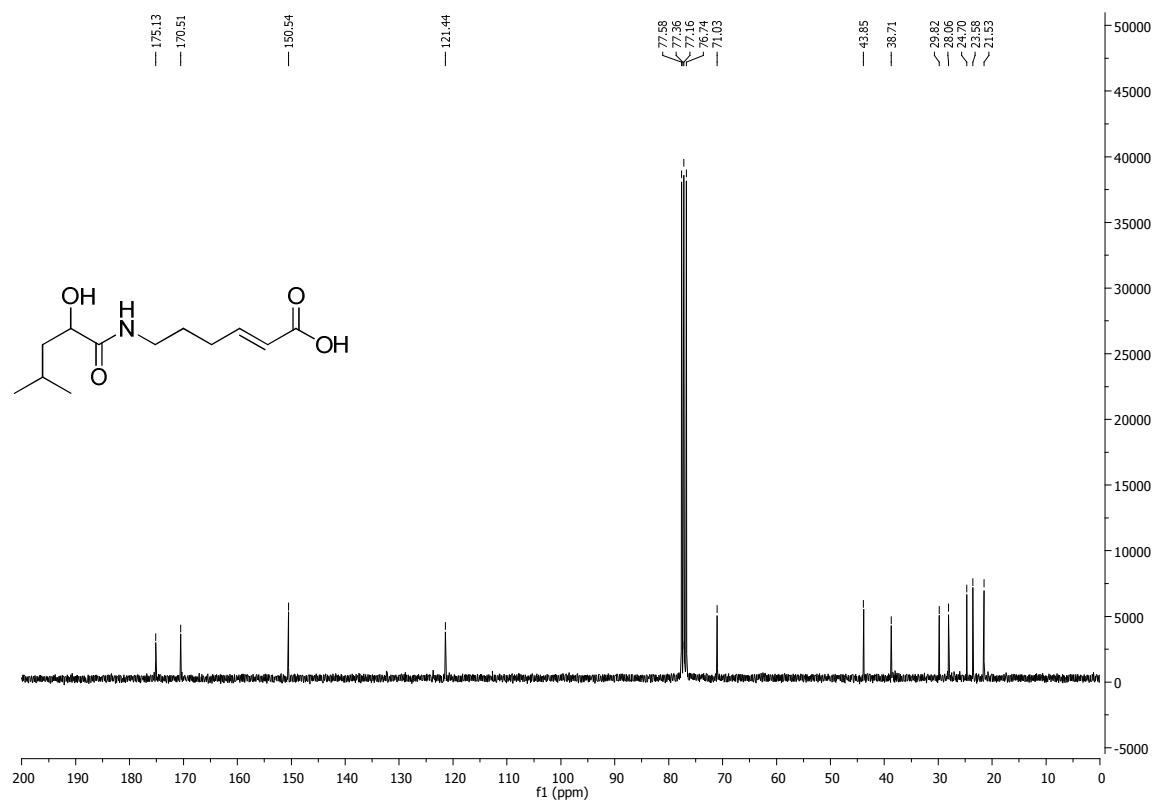
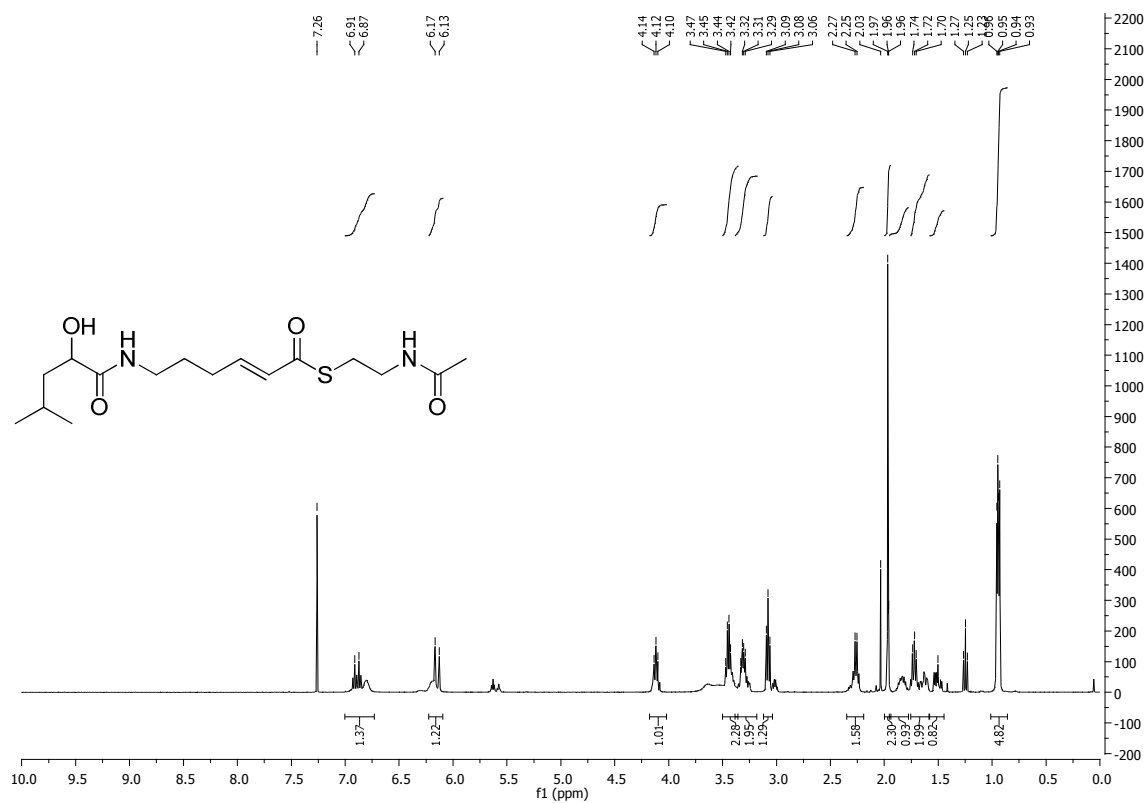
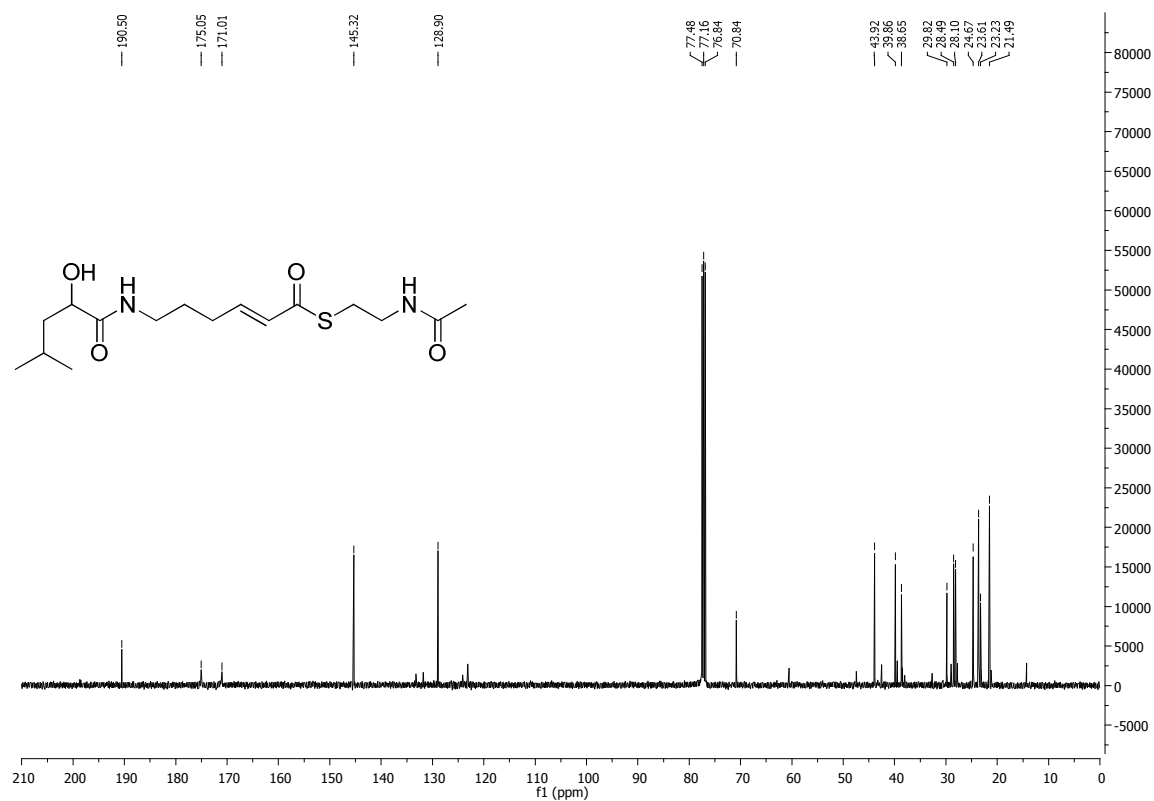


Abbildung 175: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) der Säure **156b**.

Abbildung 176: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 77.Abbildung 177: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 77.

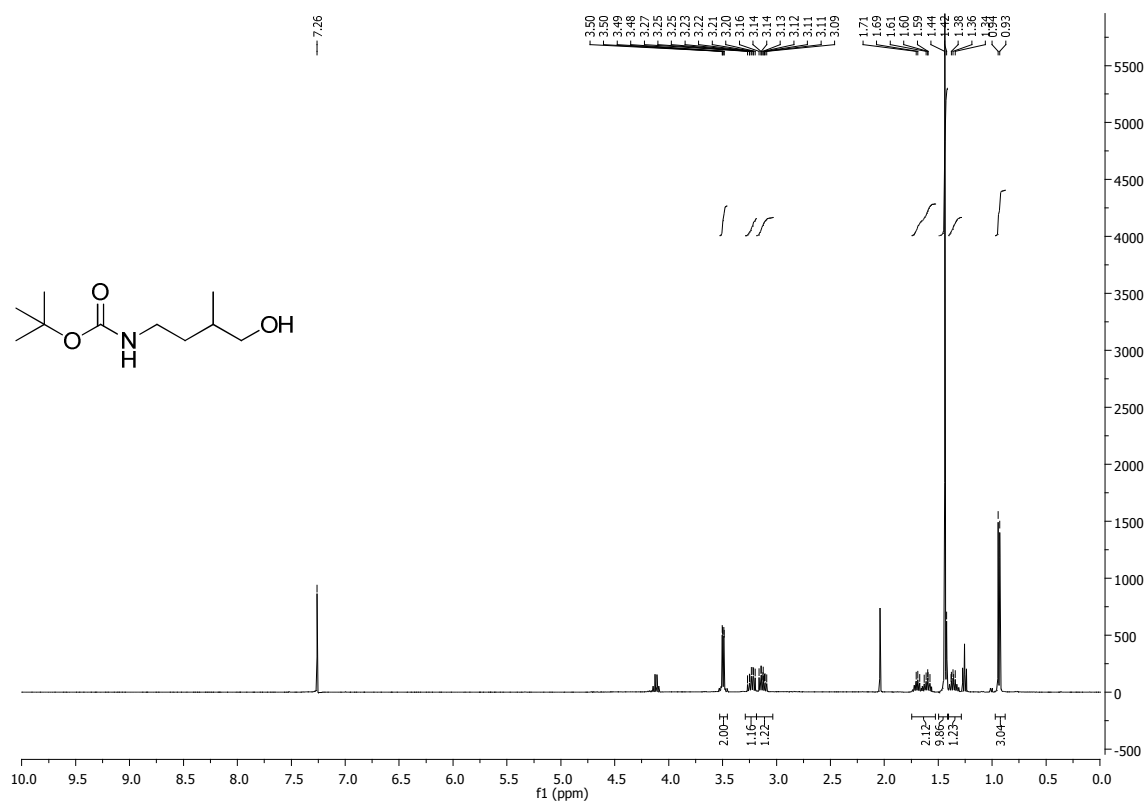


Abbildung 178: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Butanols **160c**.

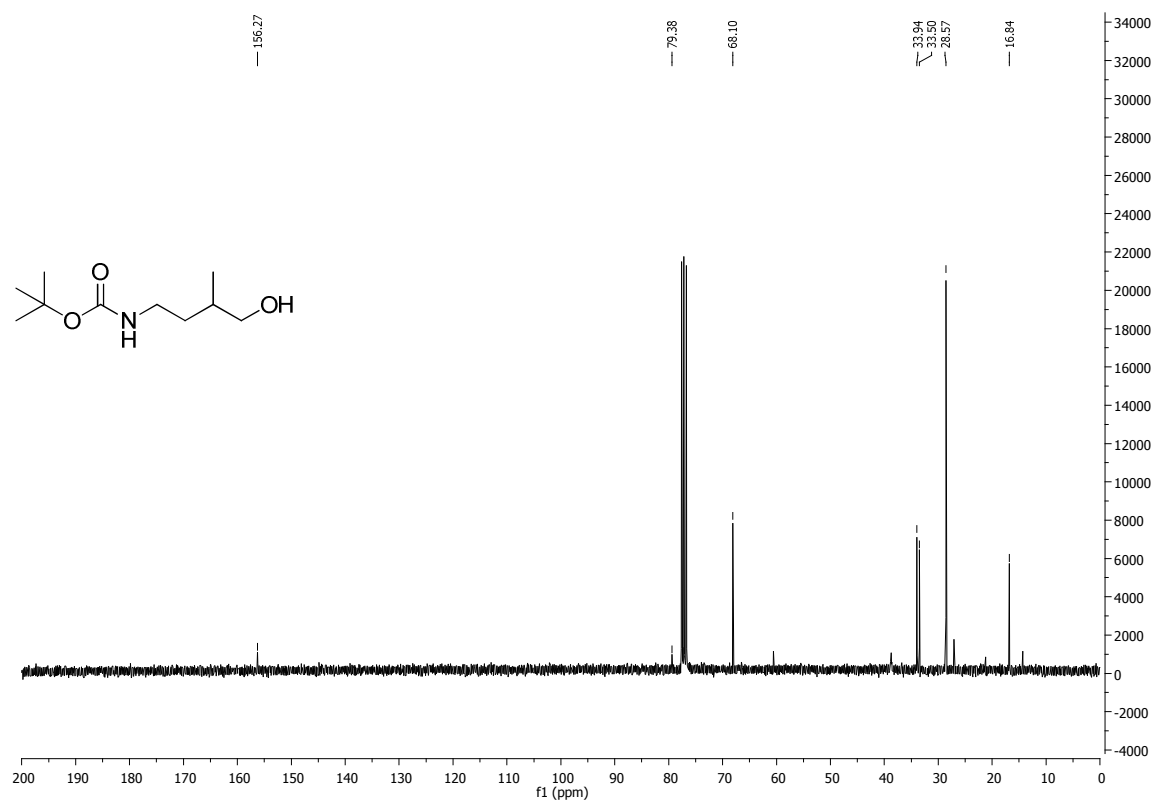


Abbildung 179: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Butanols **160c**.

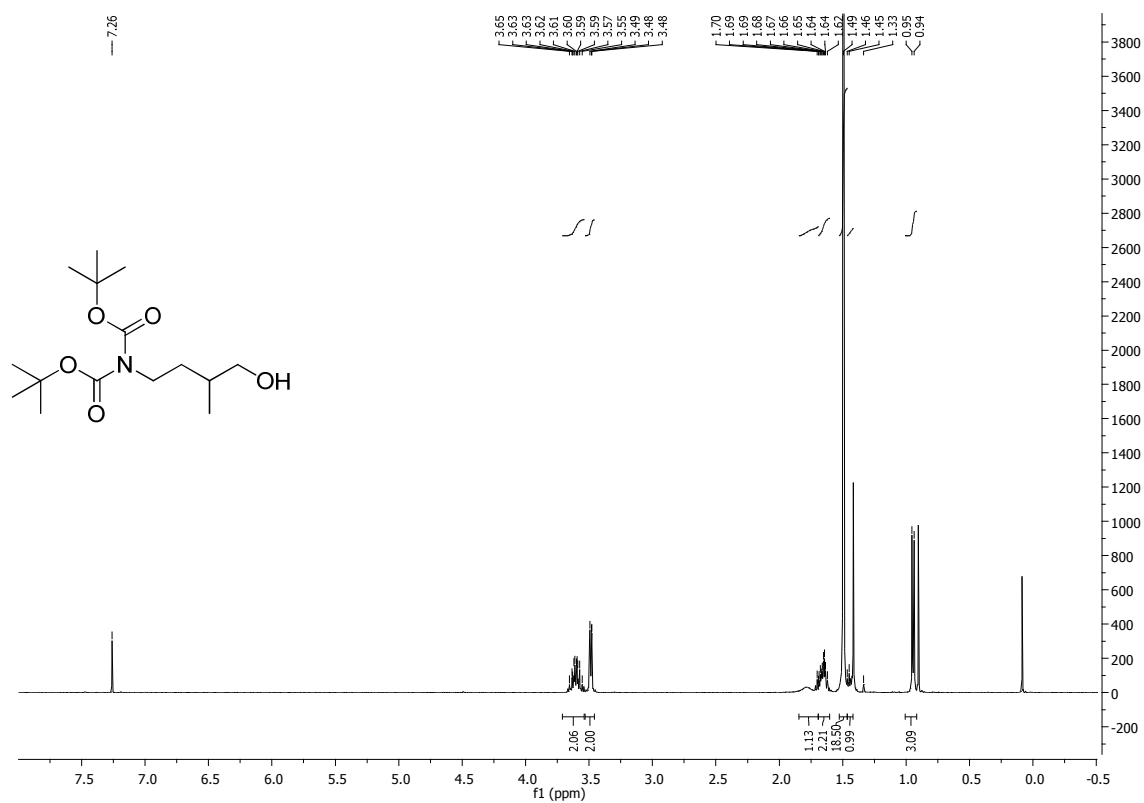


Abbildung 180: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Butanols 160d.

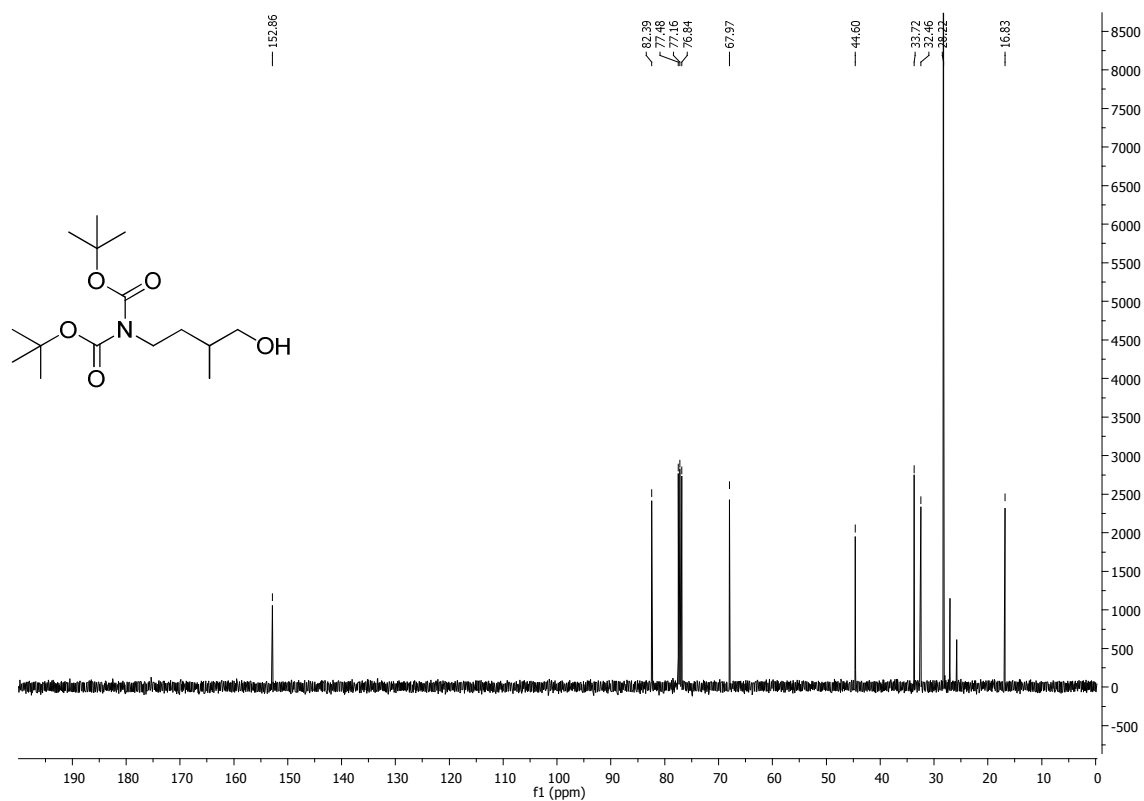


Abbildung 181: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Butanols 160d.

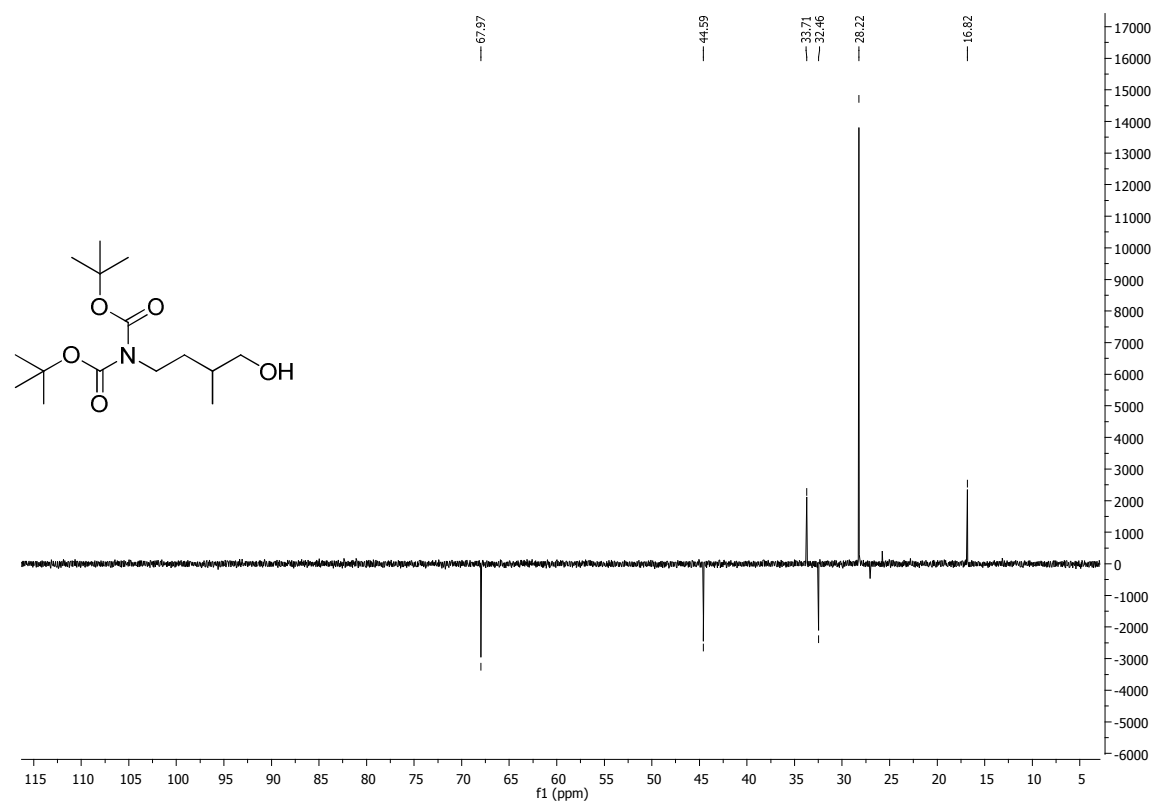
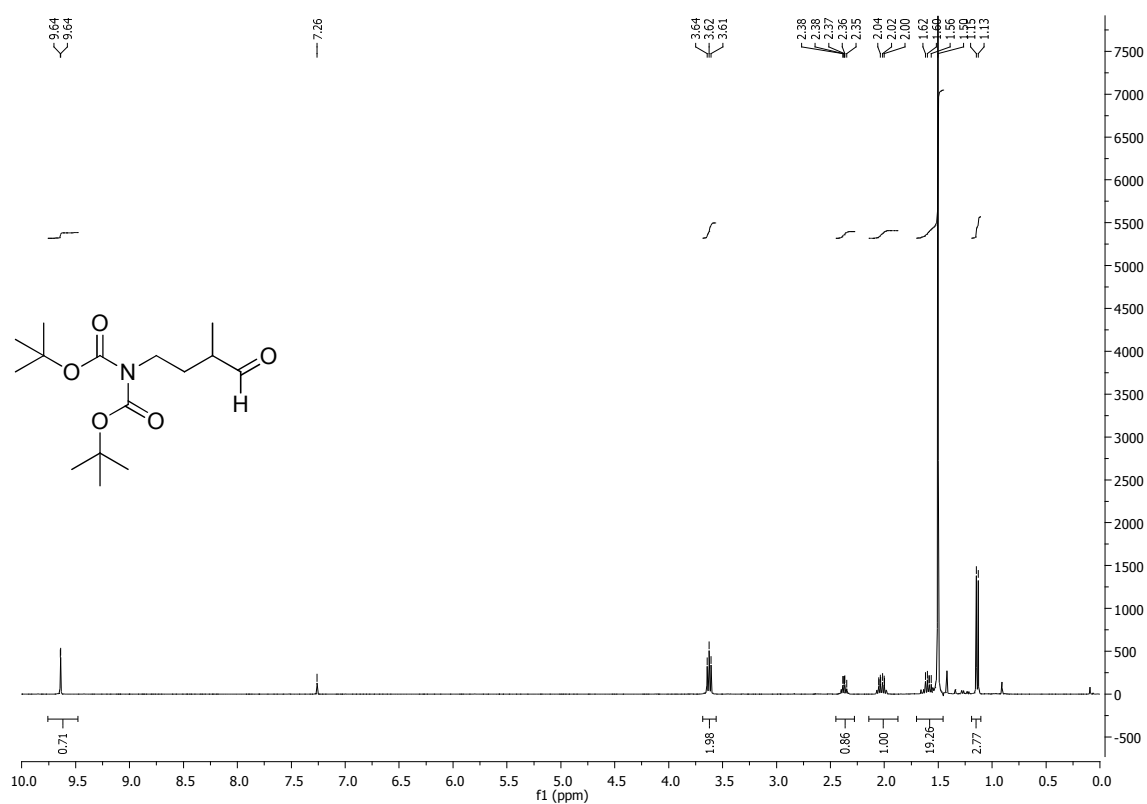


Abbildung 182: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Butanols 160d.

Abbildung 183: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Aldehyds 166.

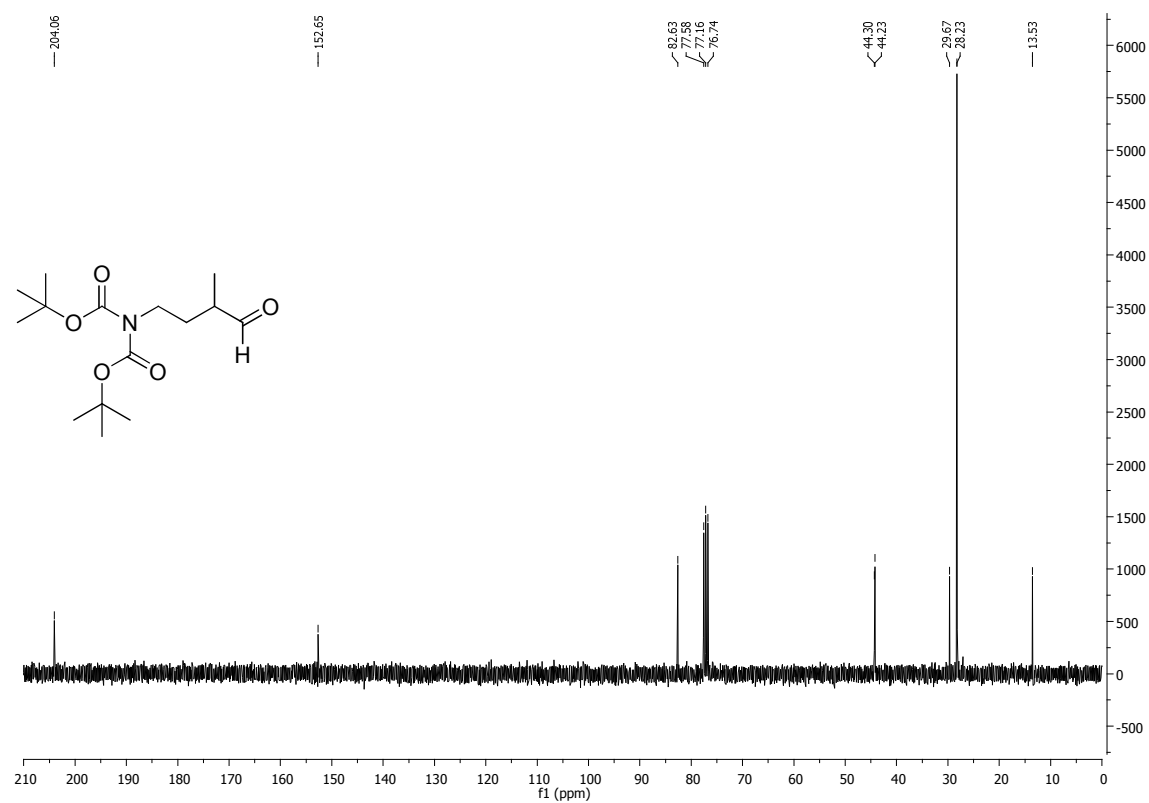


Abbildung 184: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Aldehyds **166**.

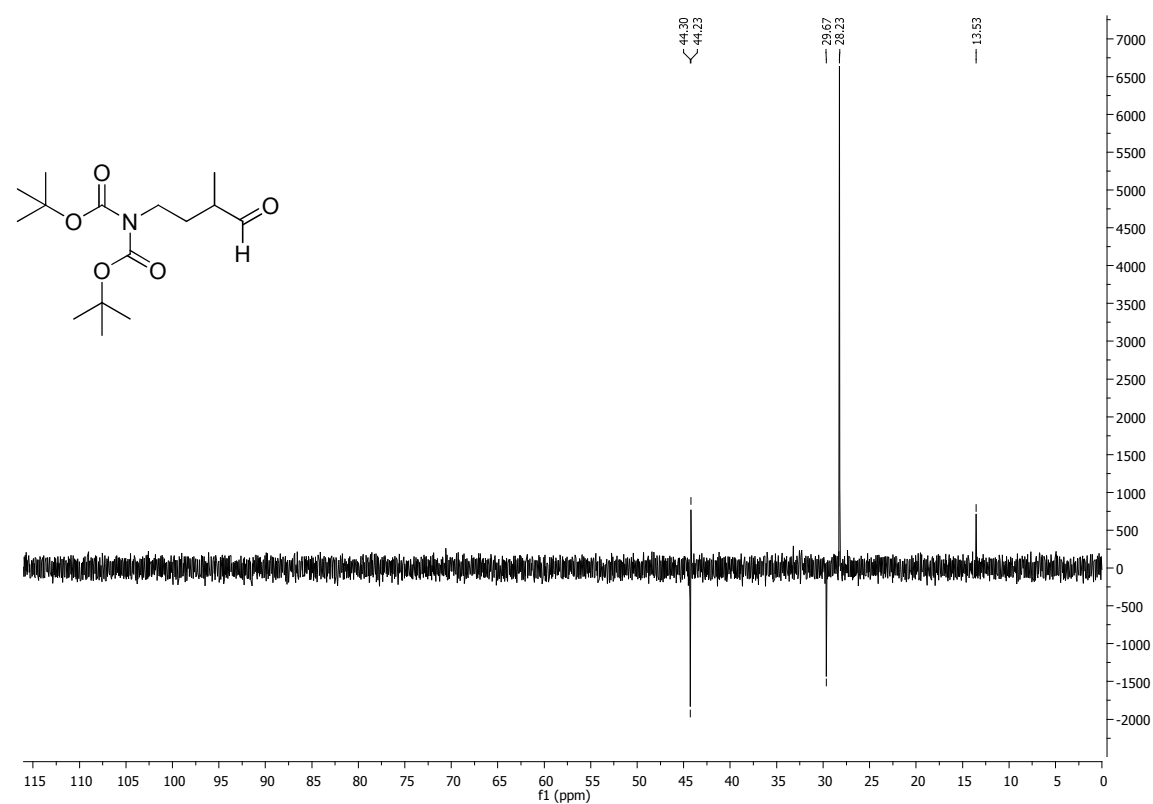


Abbildung 185: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Aldehyds **166**.

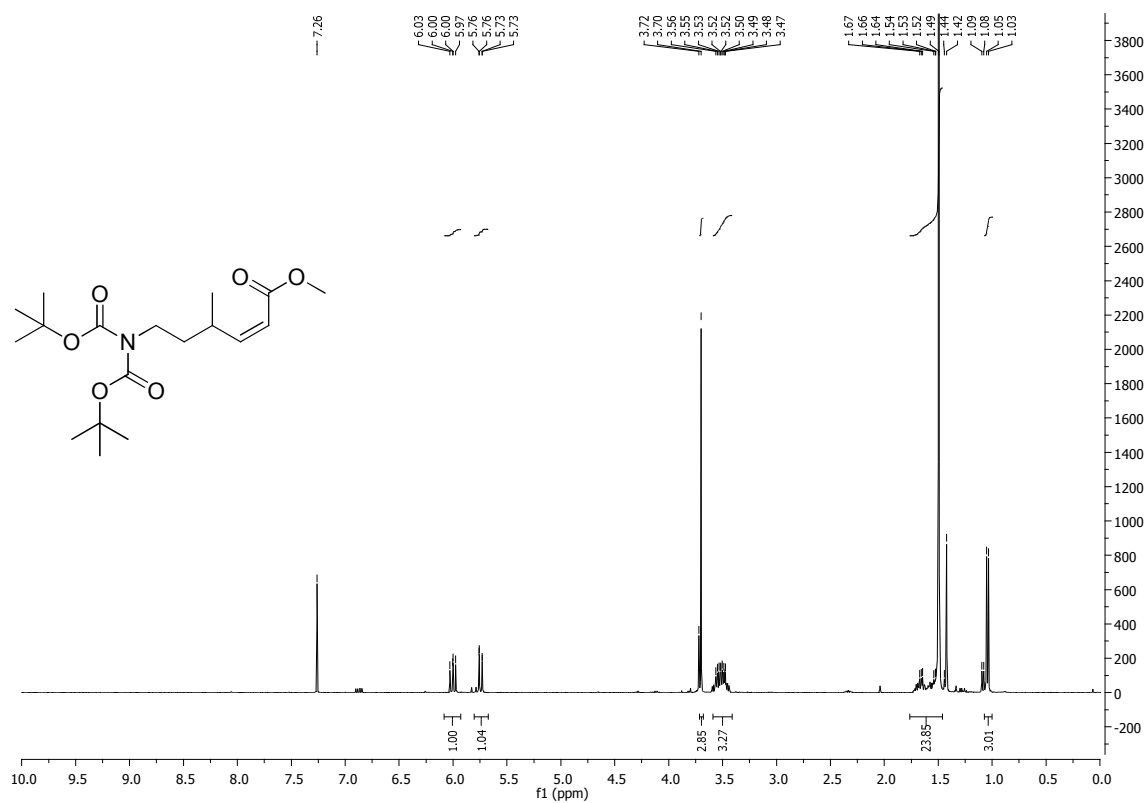


Abbildung 186: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Methylesters **167a**.

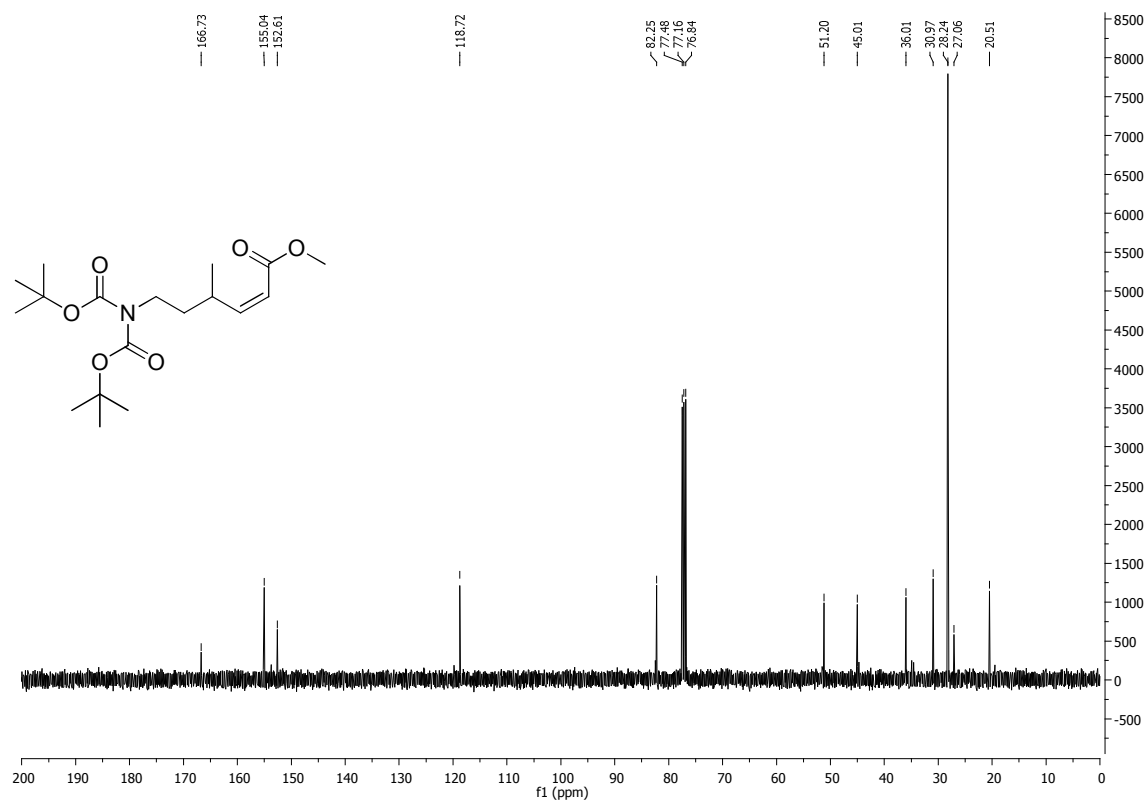
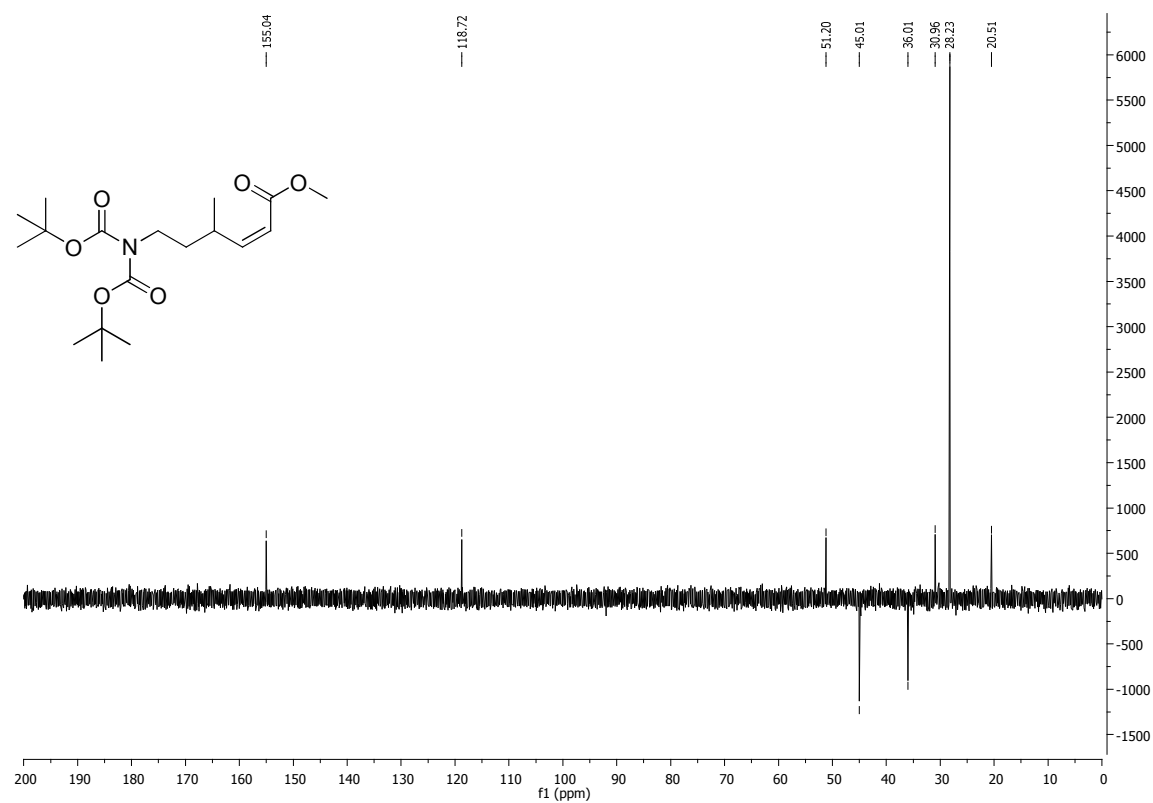
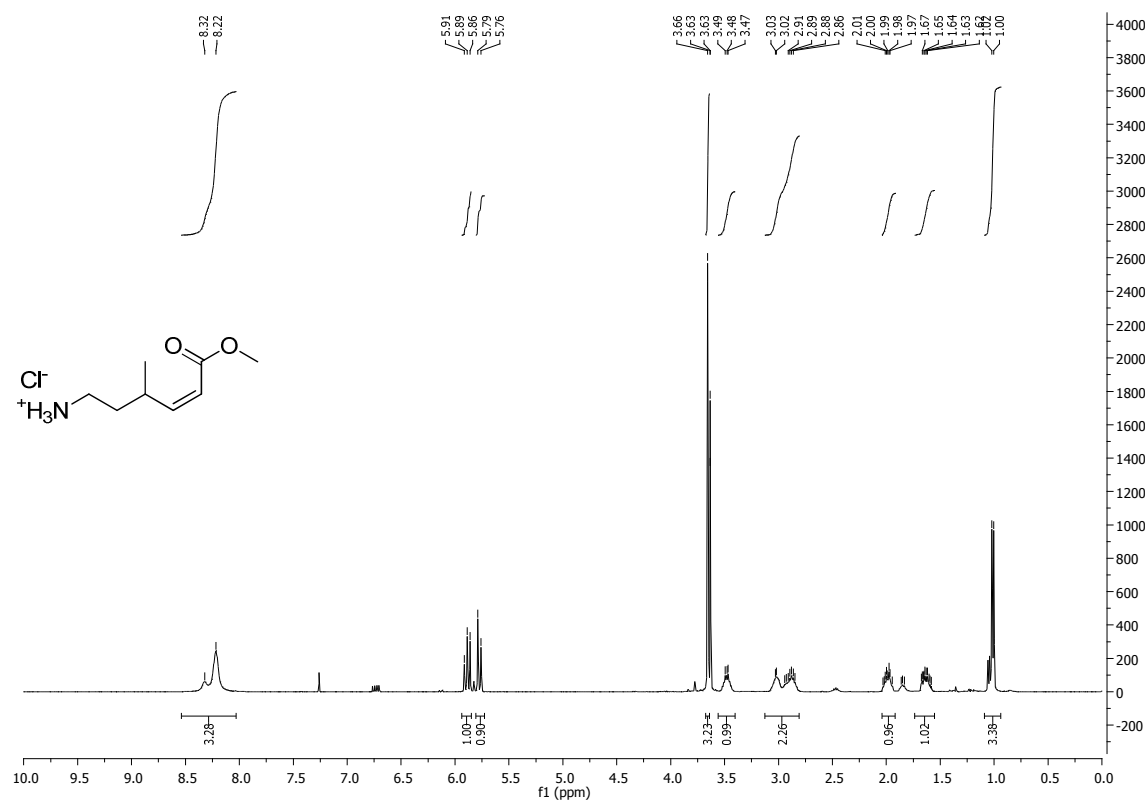


Abbildung 187: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Methylesters **167a**.

Abbildung 188: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Methylesters **167a**.Abbildung 189: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Hydrochlorids **167b**.

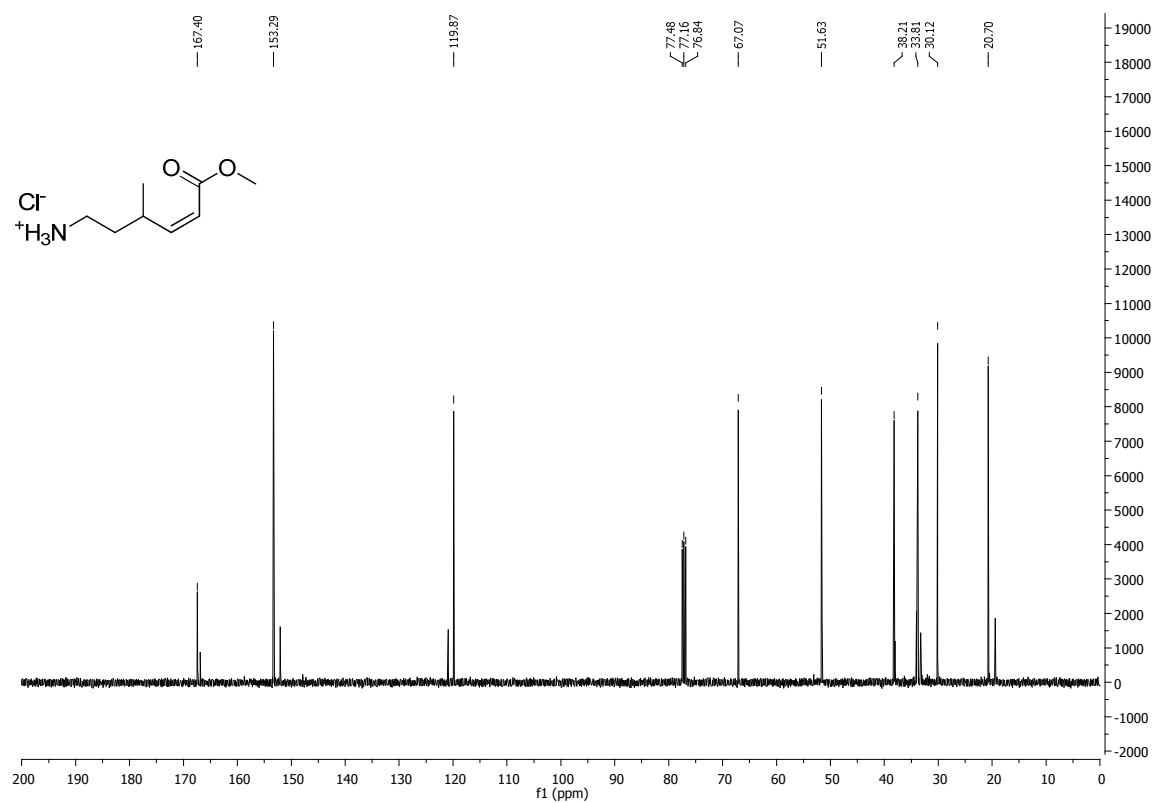


Abbildung 190: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Hydrochlorids **167b**.

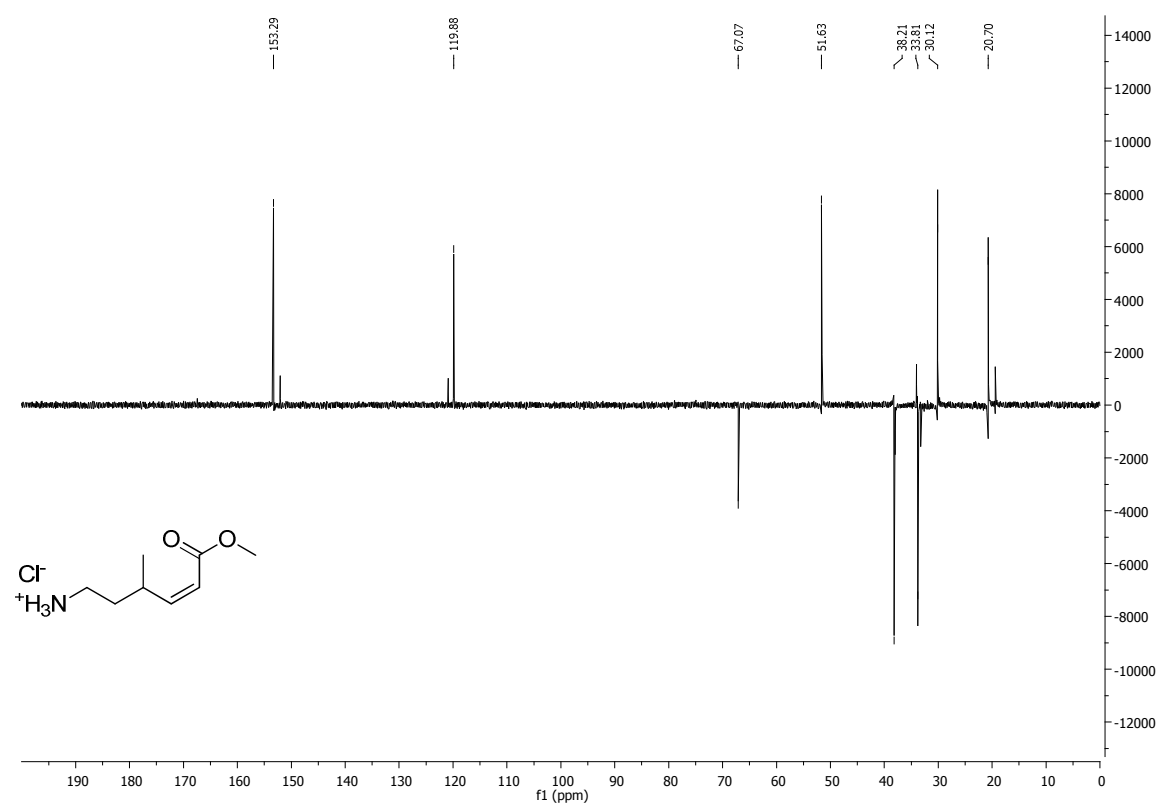
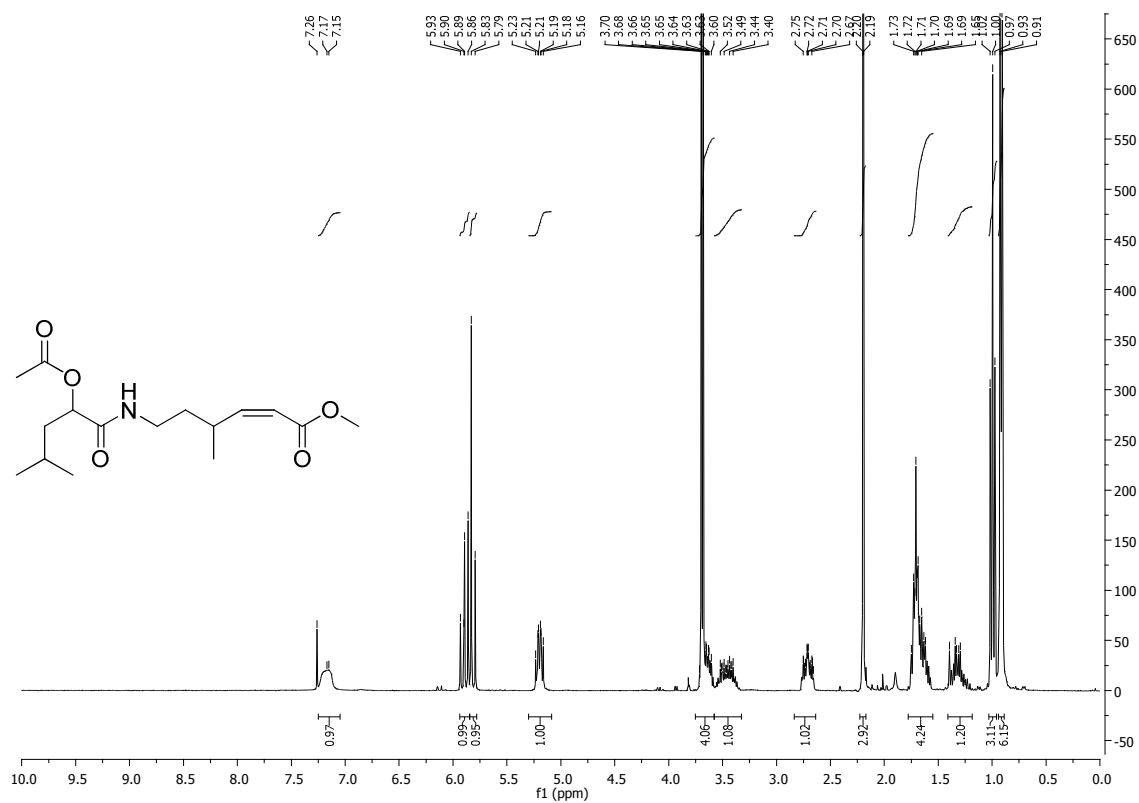
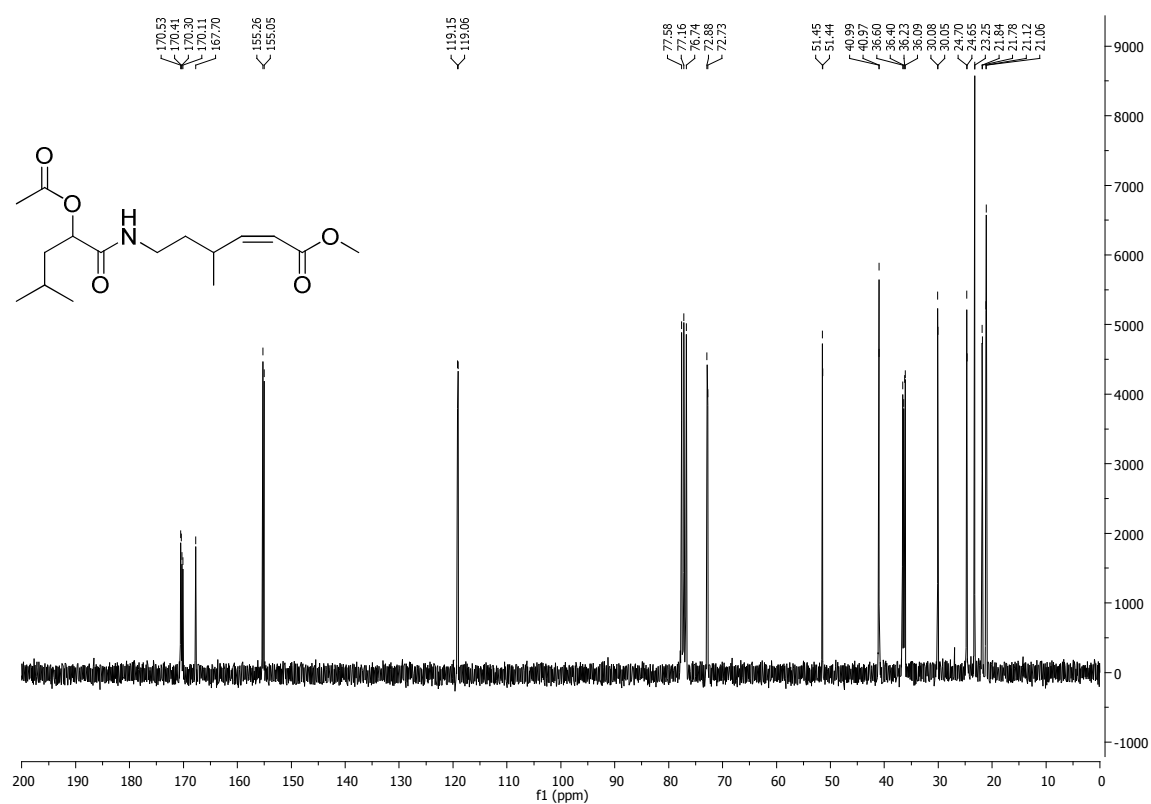


Abbildung 191: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Hydrochlorids **167b**.

Abbildung 192: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Amids 168a.Abbildung 193: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Amids 168a.

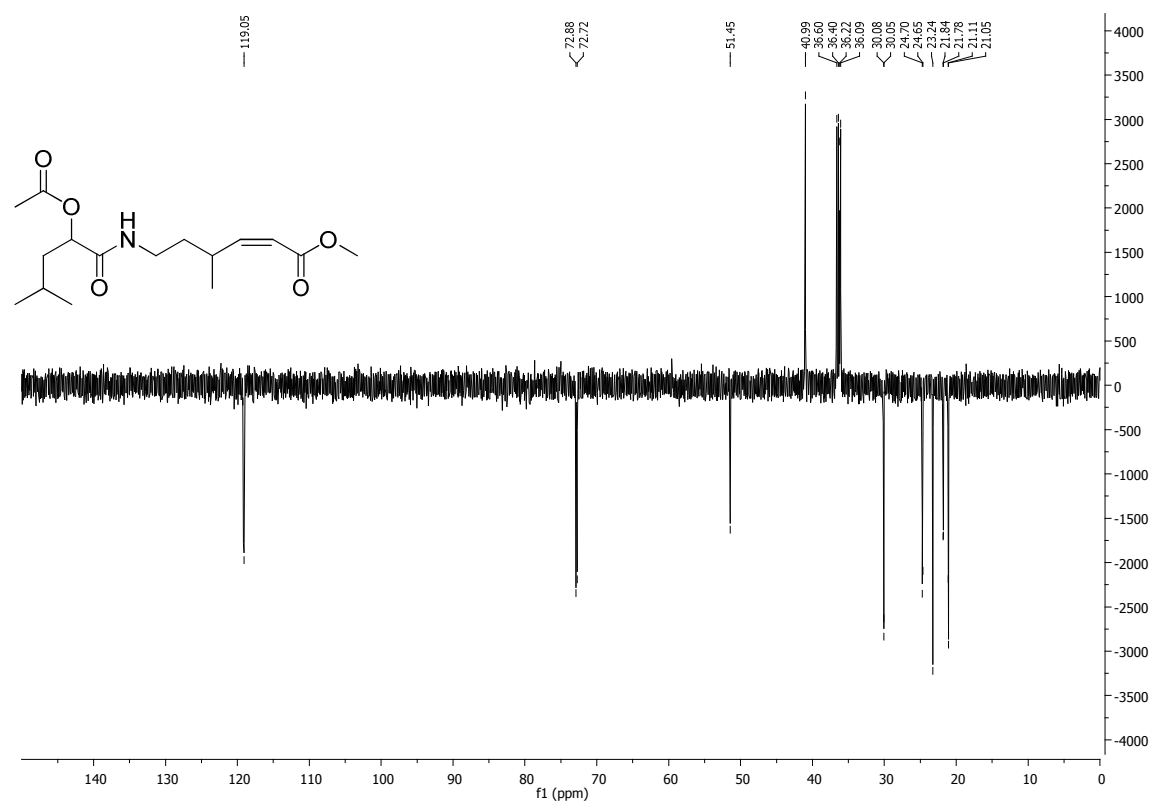
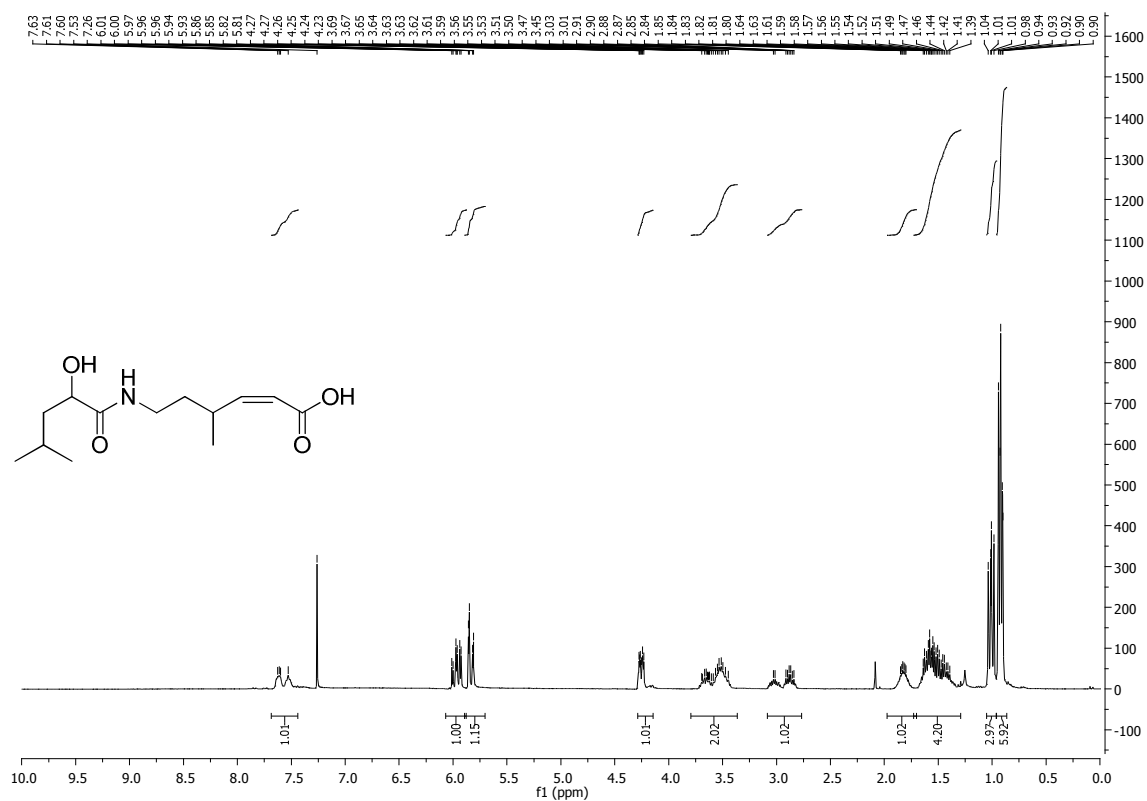


Abbildung 194: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Amids 168a.

Abbildung 195: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure 168b.

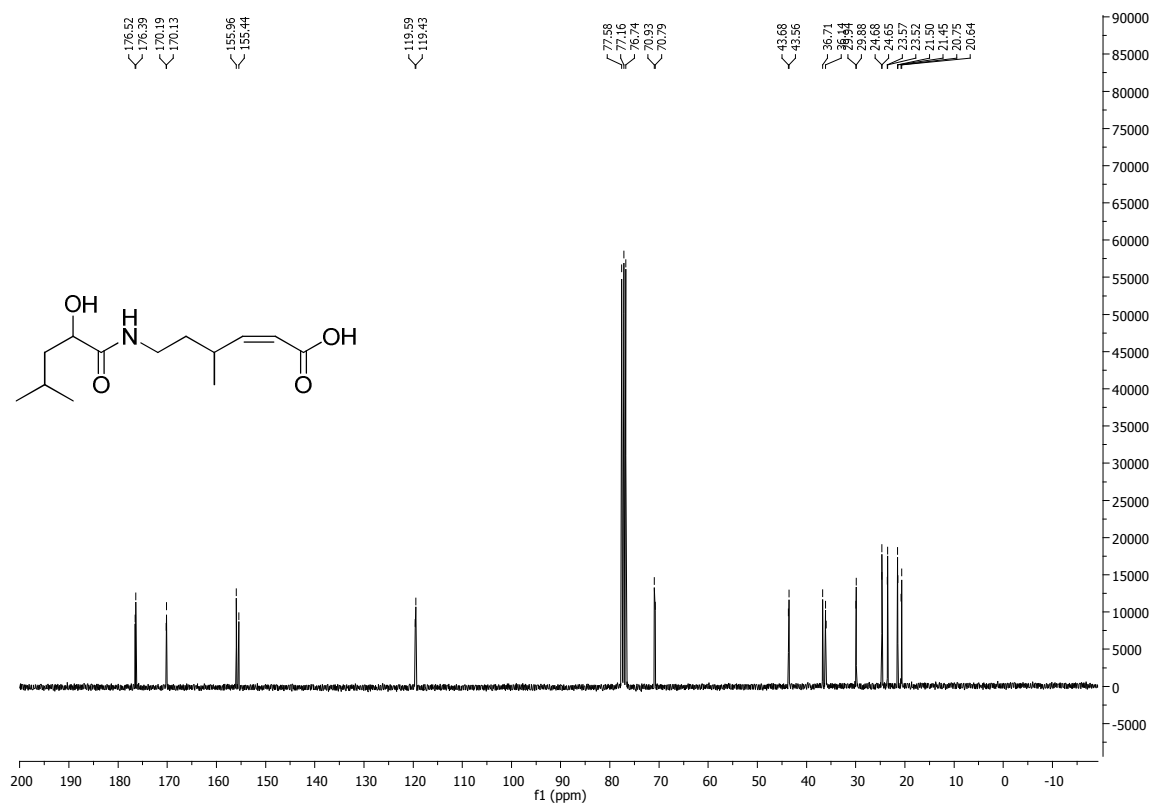
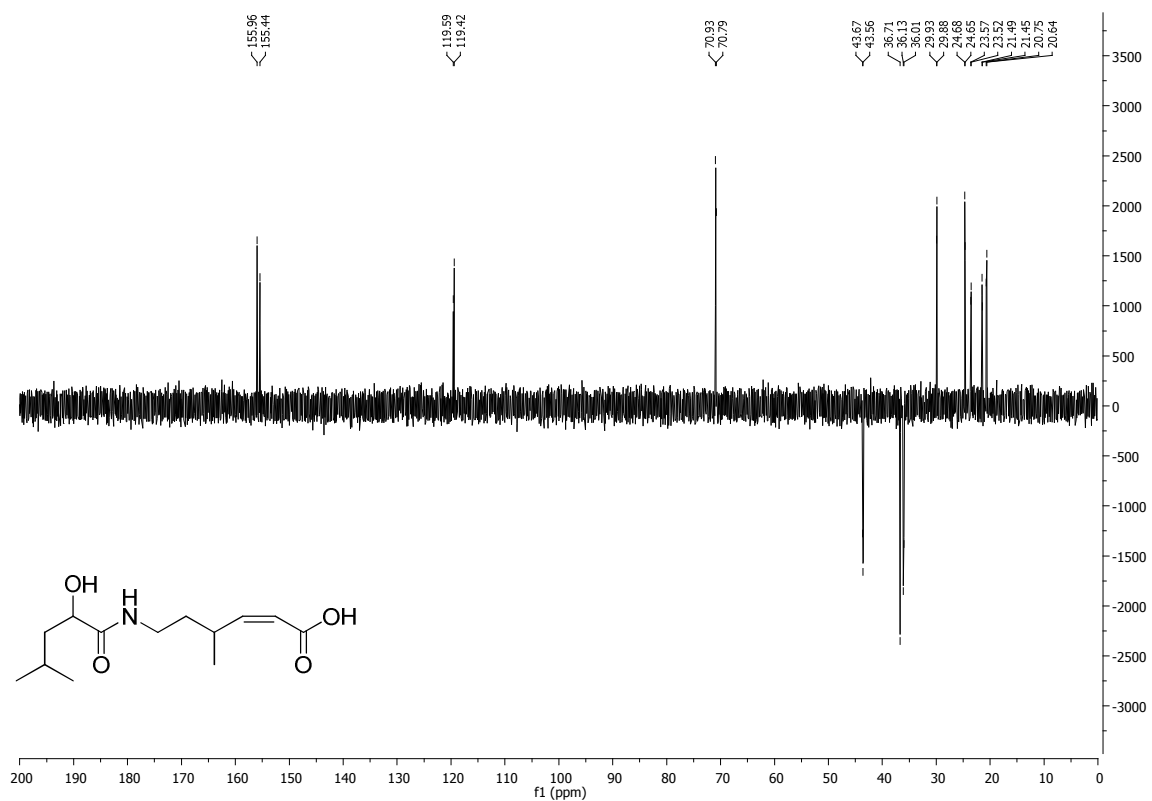
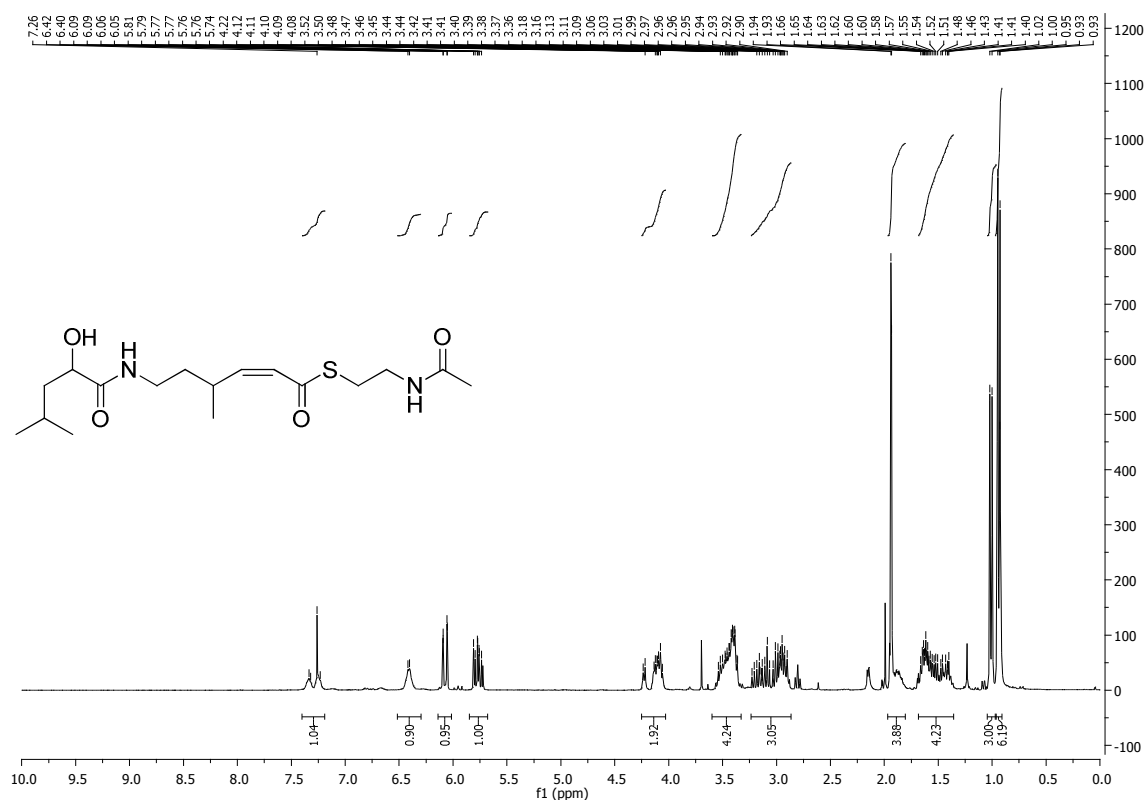
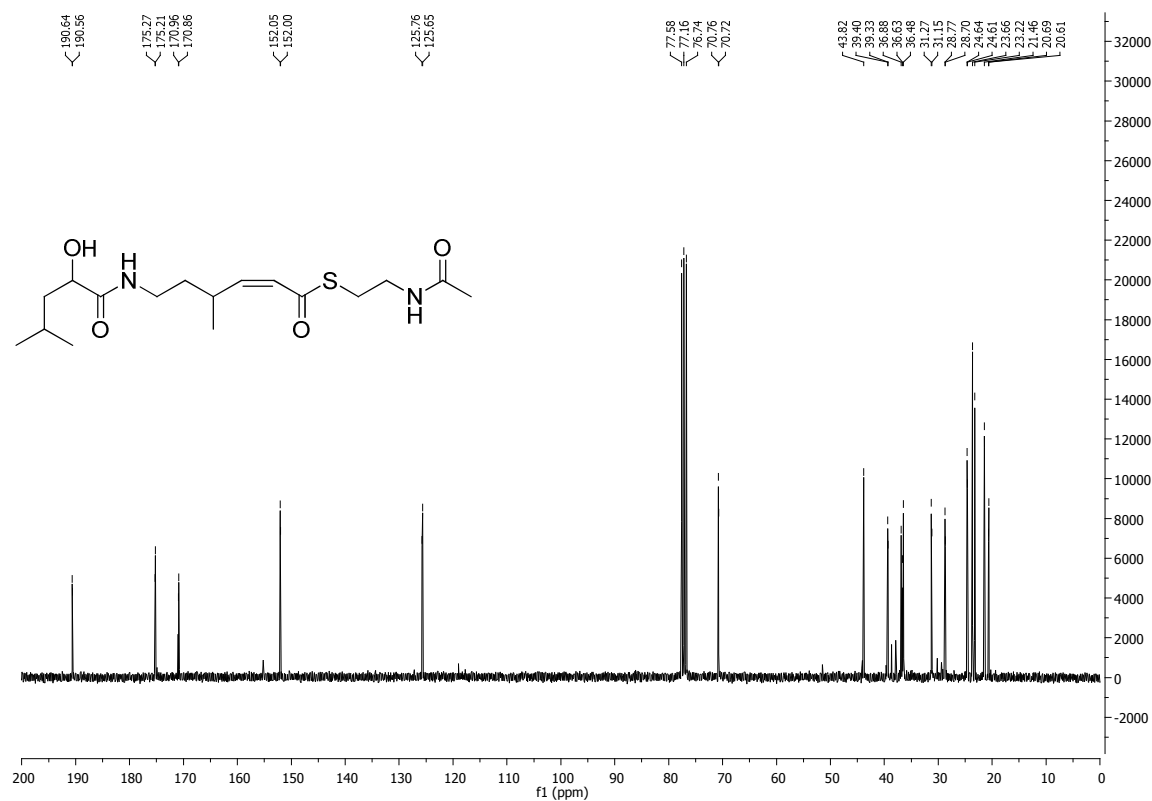
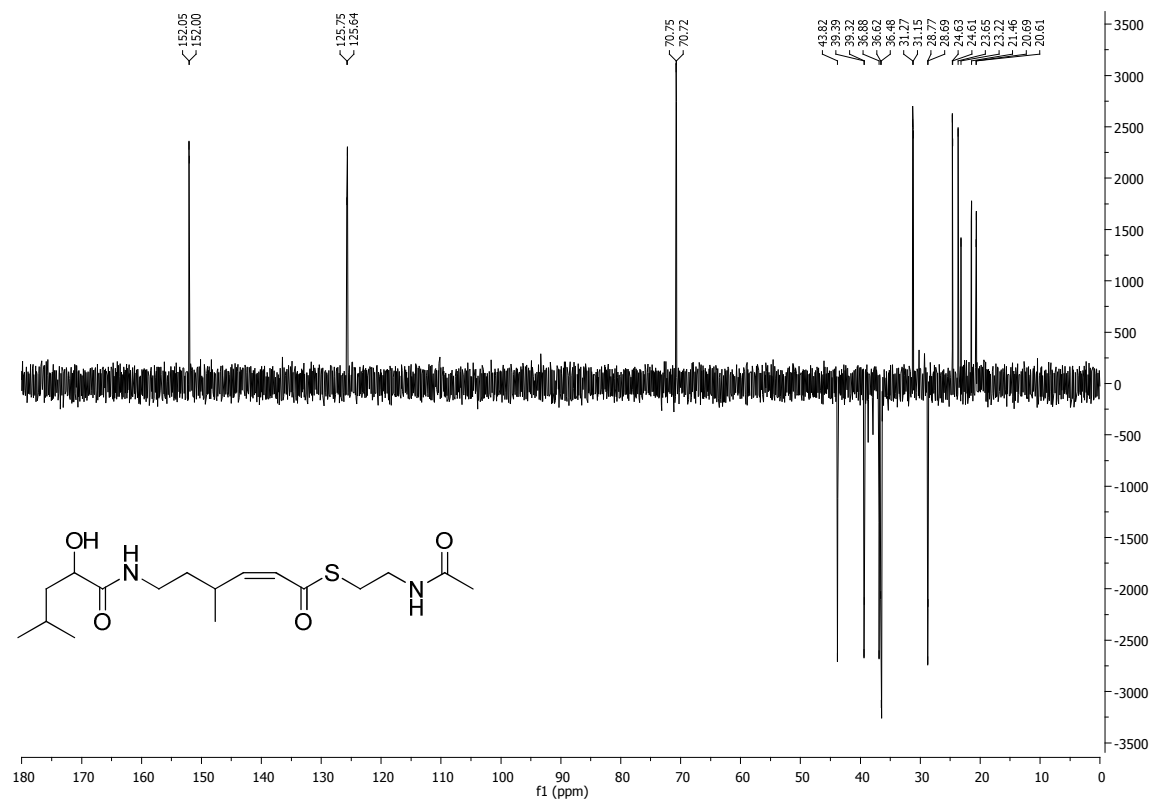
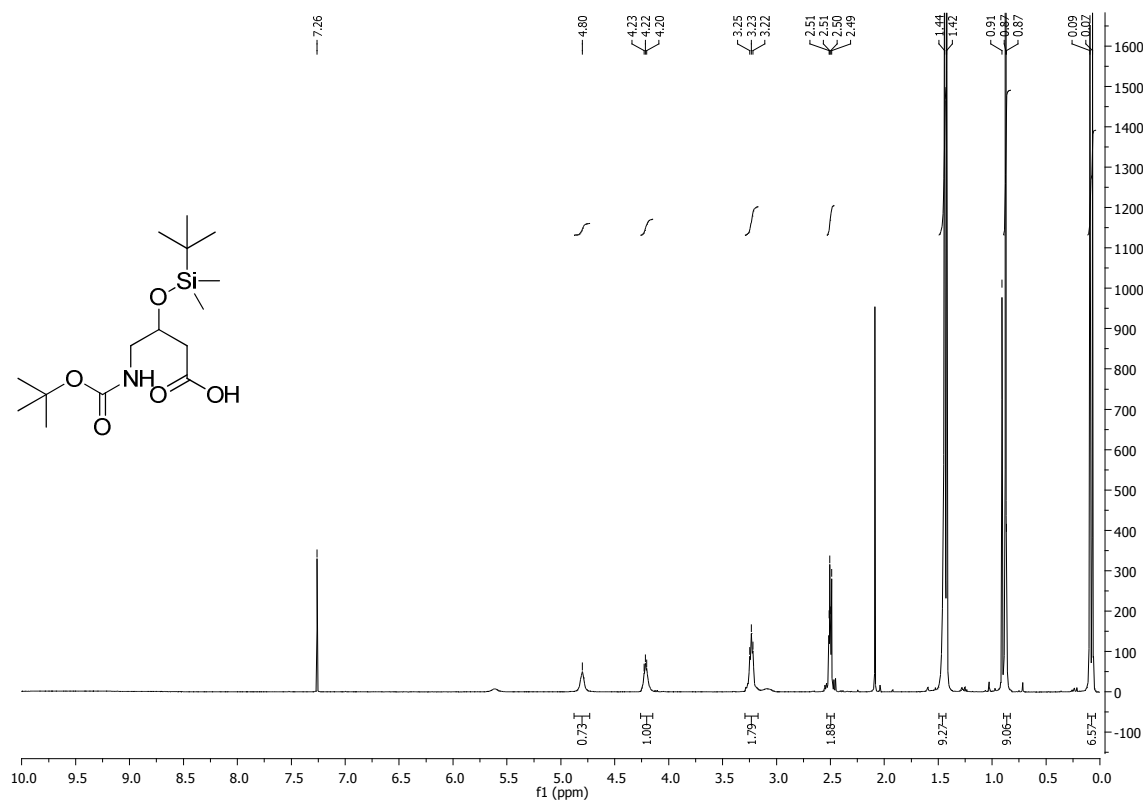
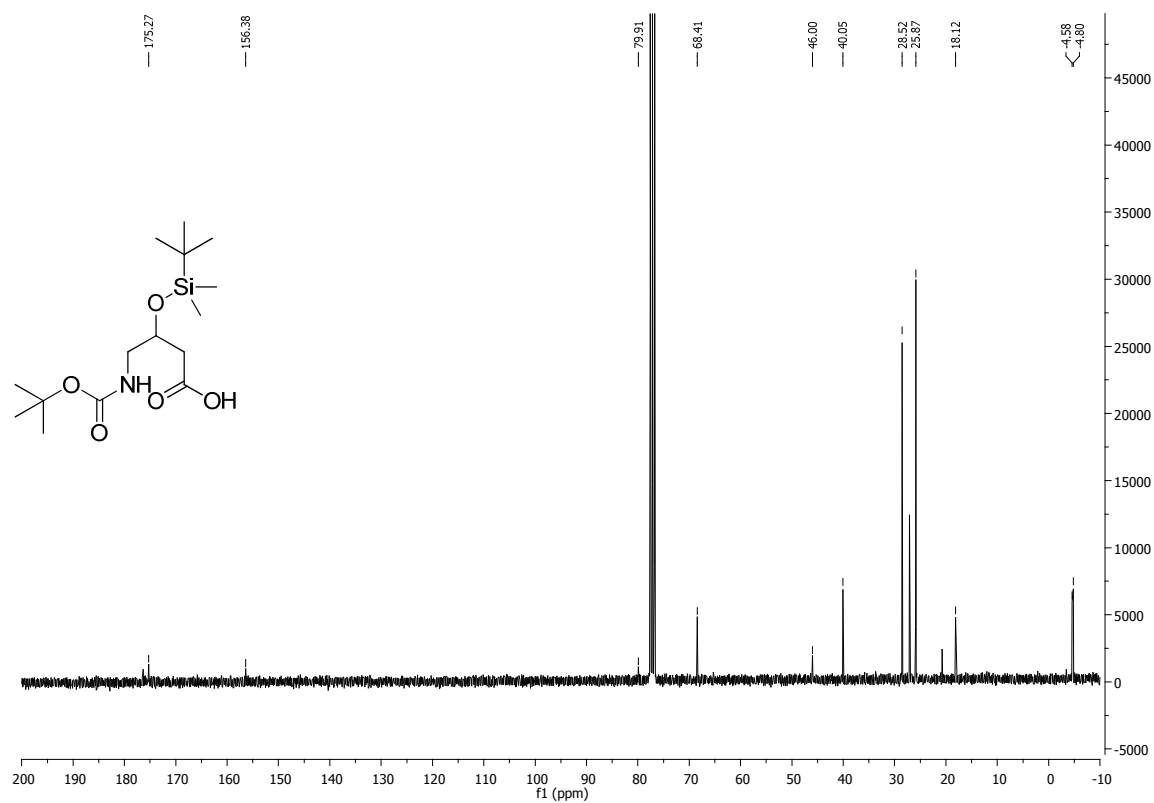
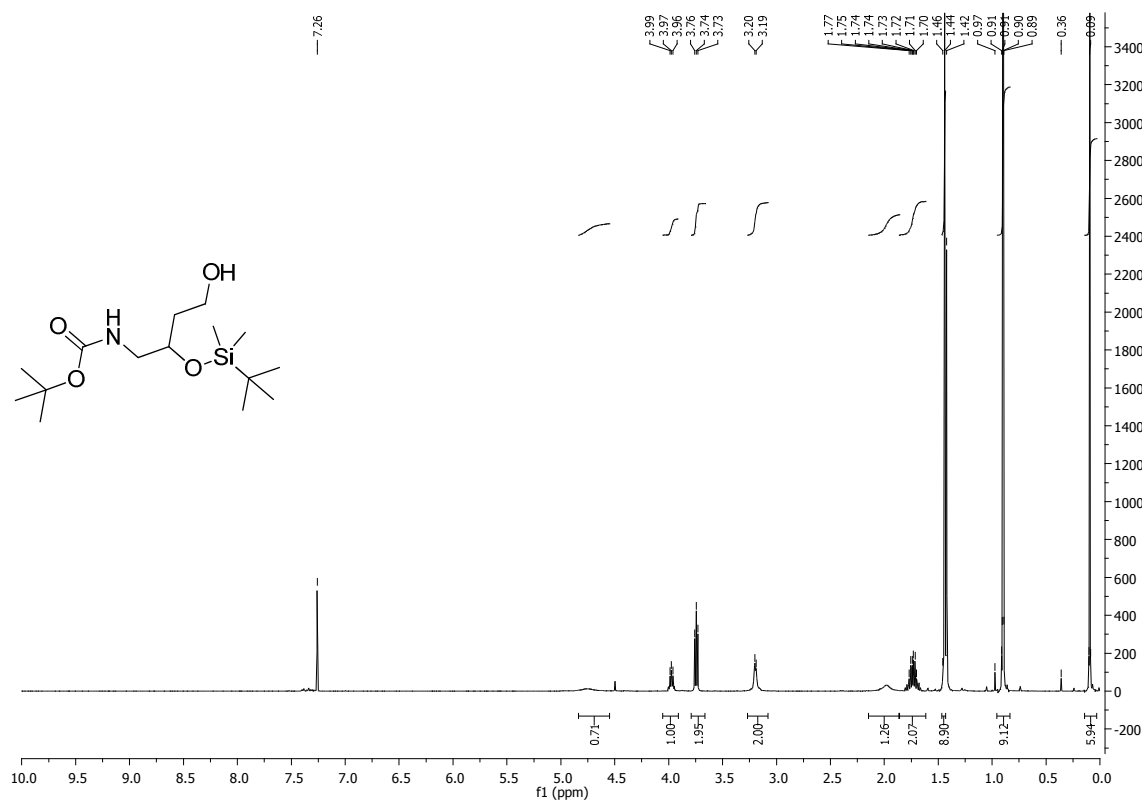
Abbildung 196: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) der Säure 168b.

Abbildung 197: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) der Säure 168b.

Abbildung 198: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 78.Abbildung 199: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 78.

Abbildung 200: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Thioesters **78**.Abbildung 201: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure **178e**.

Abbildung 202: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) der Säure 178e.Abbildung 203: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Alkohols 179a.

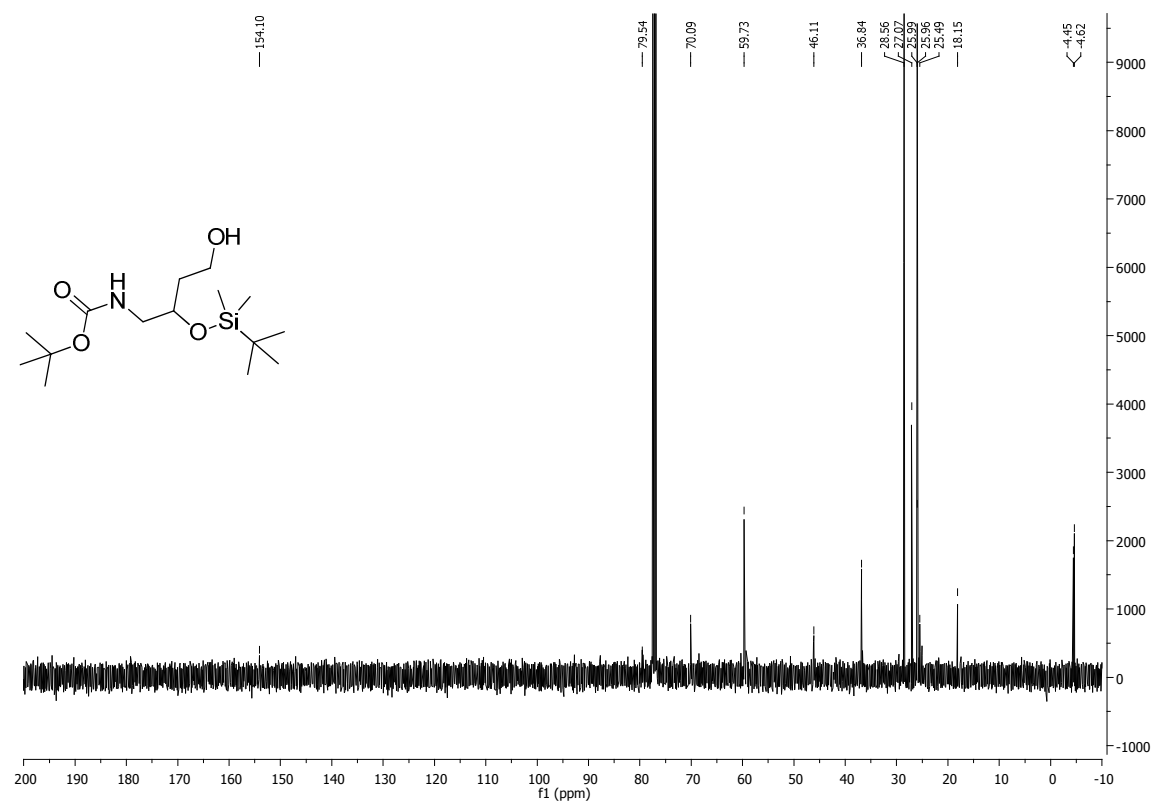


Abbildung 204: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Alkohols 179a.

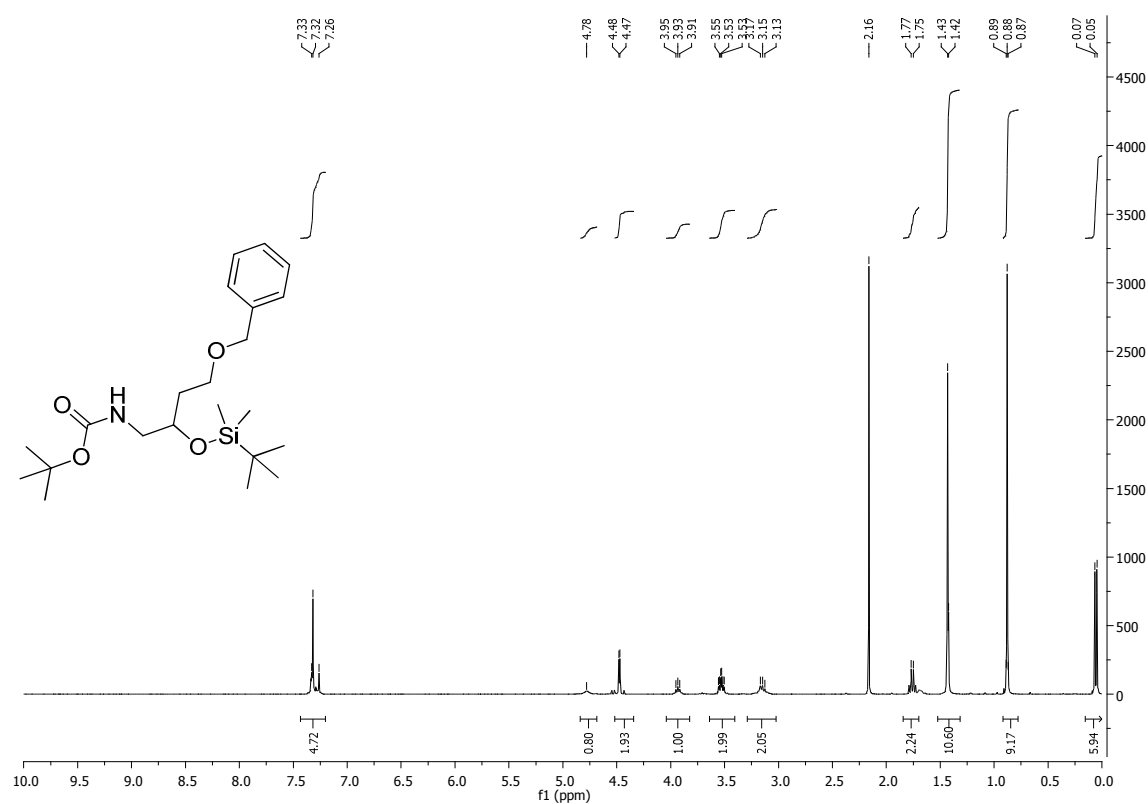
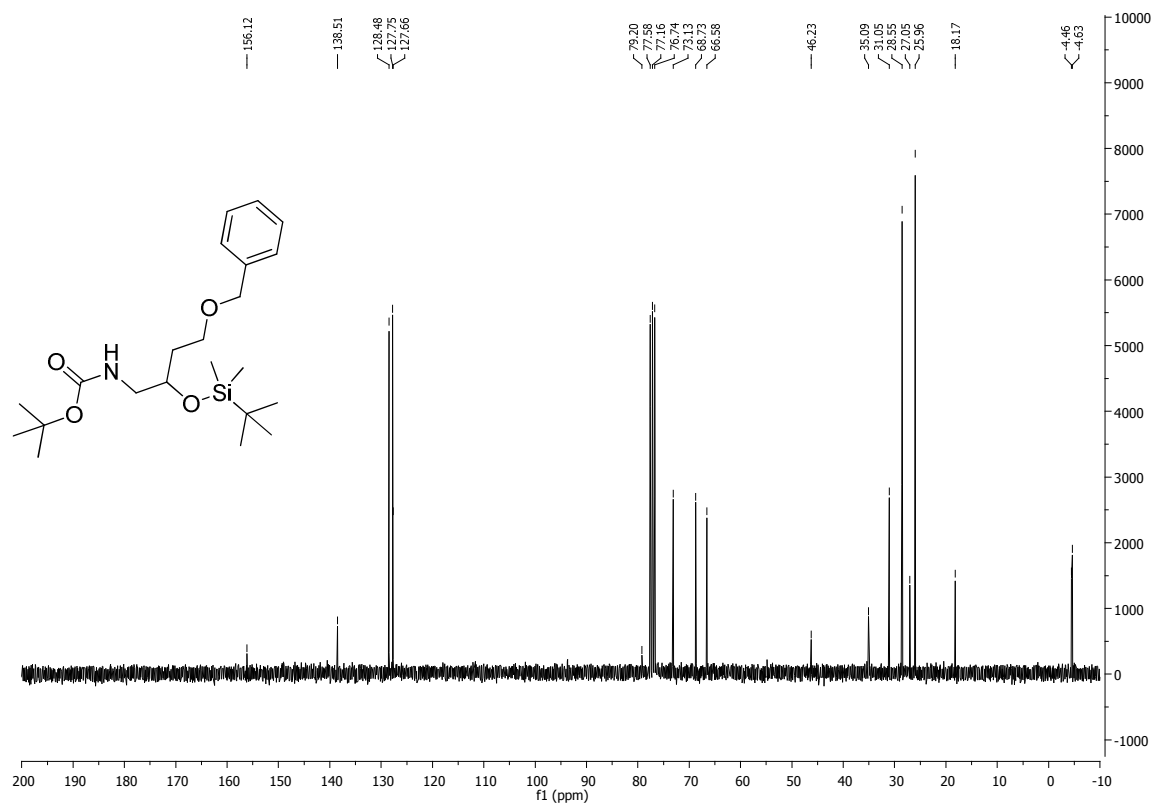
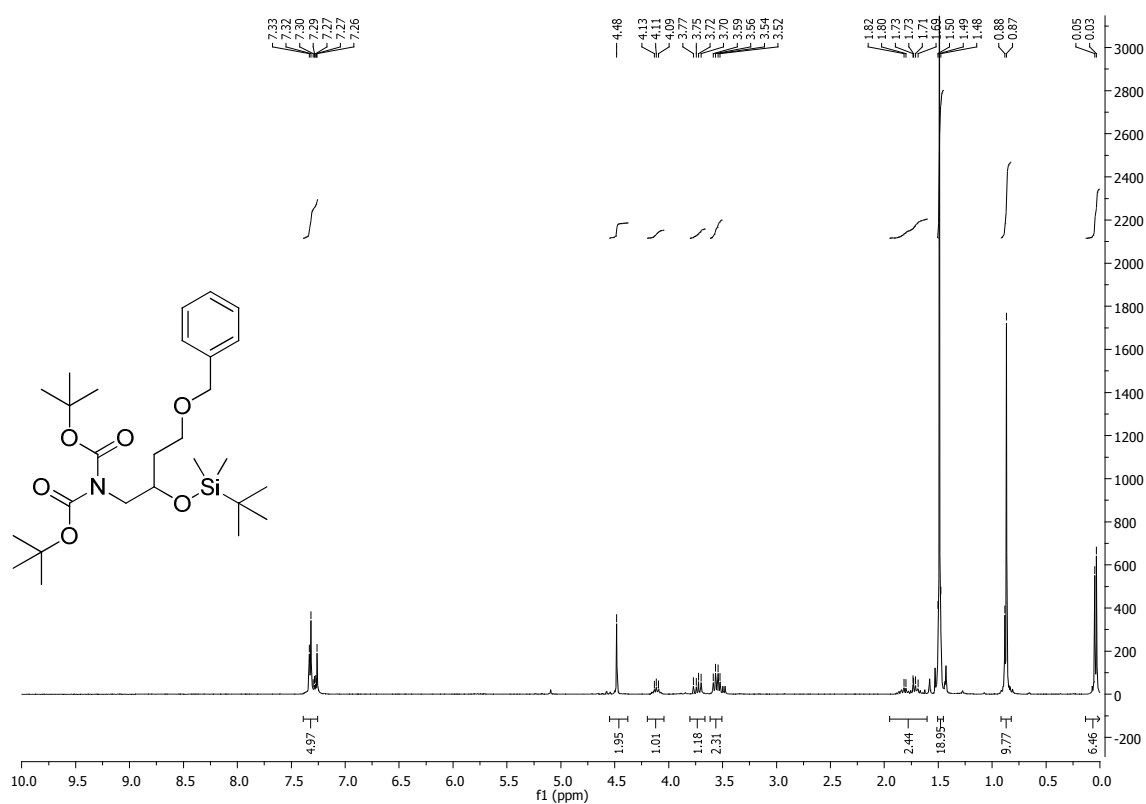


Abbildung 205: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Benzylethers 179b.

Abbildung 206: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Benzylethers 179b.Abbildung 207: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Benzylethers 179i.

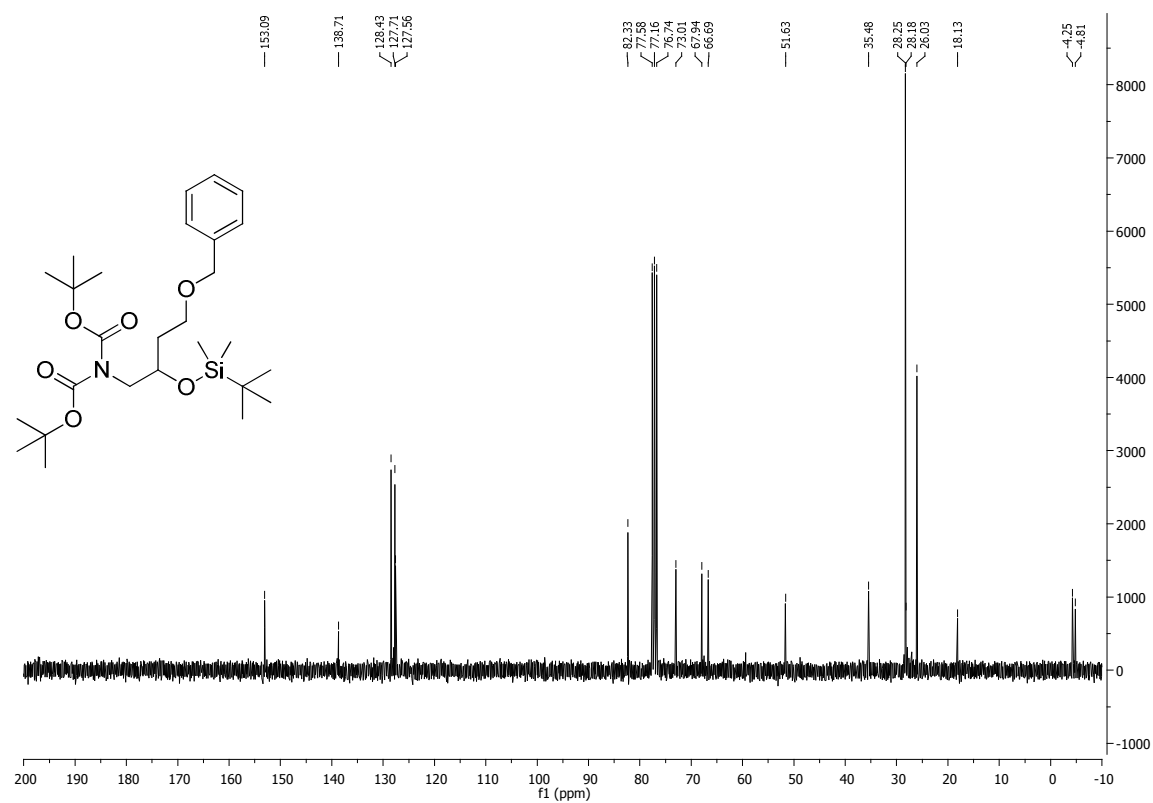


Abbildung 208: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Benzylethers 179i.

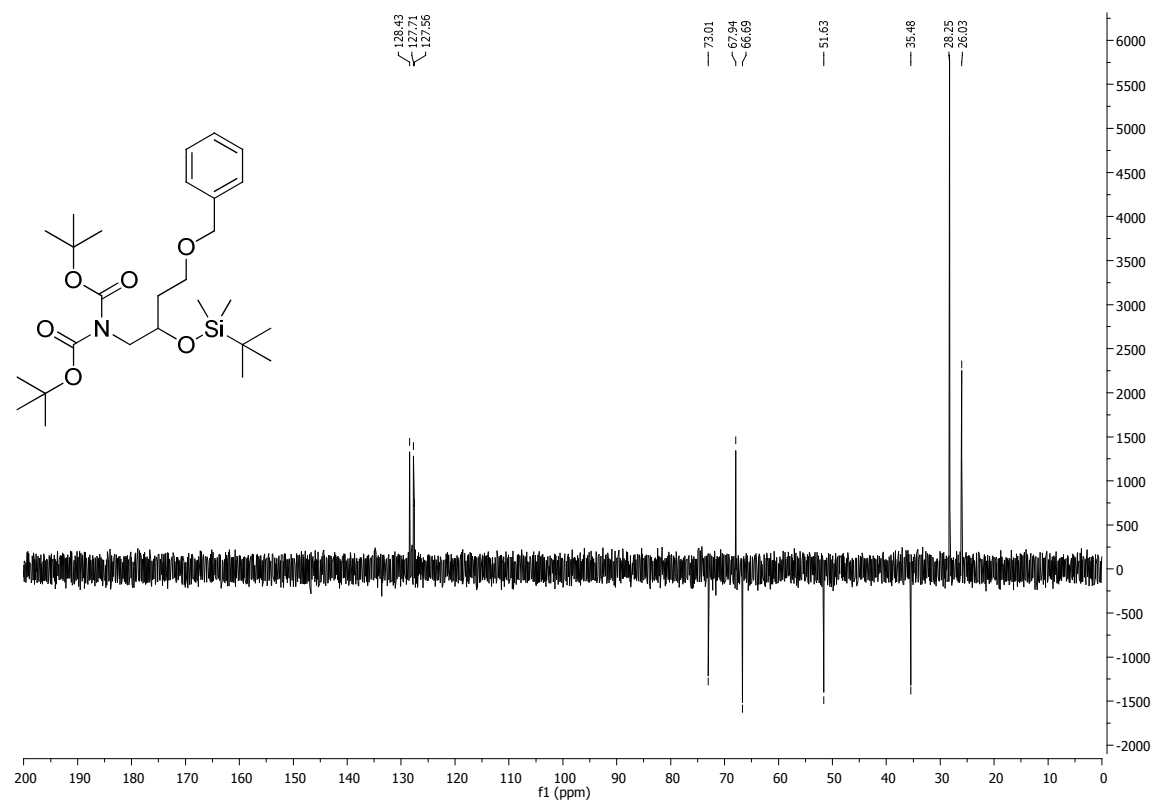


Abbildung 209: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Benzylethers 179i.

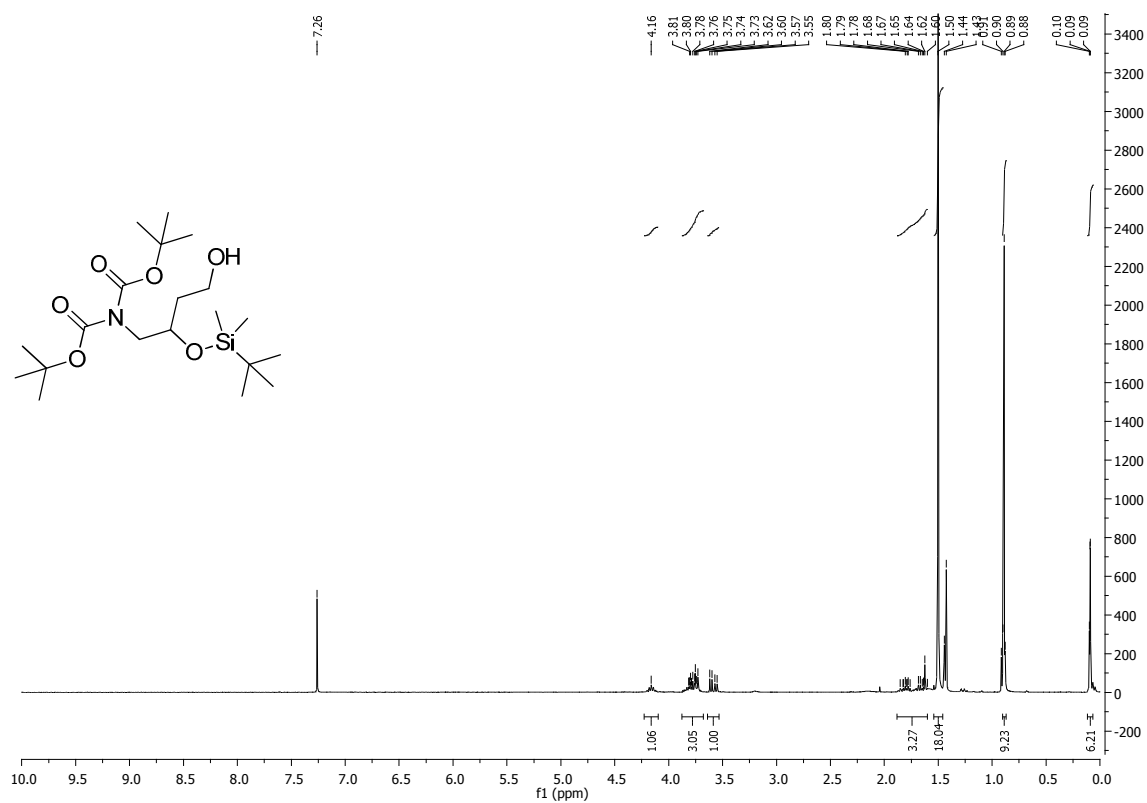


Abbildung 210: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Alkohols 179j.

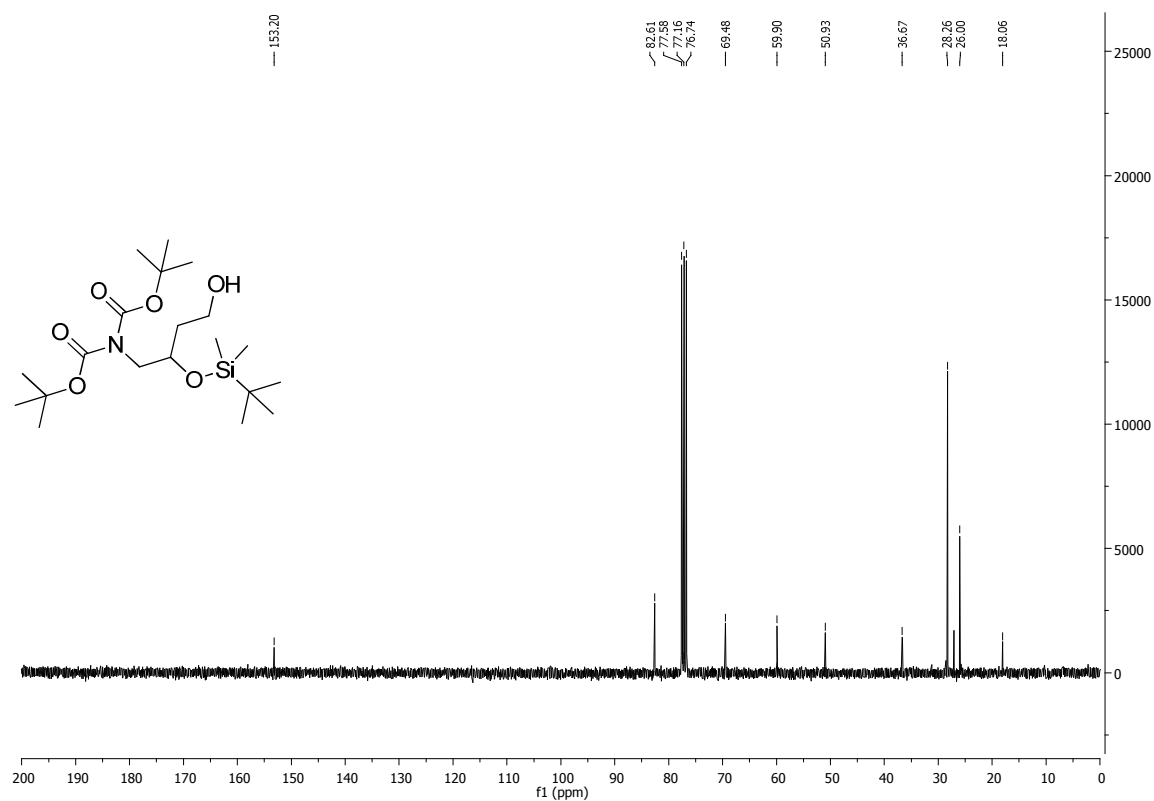


Abbildung 211: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Alkohols 179j.

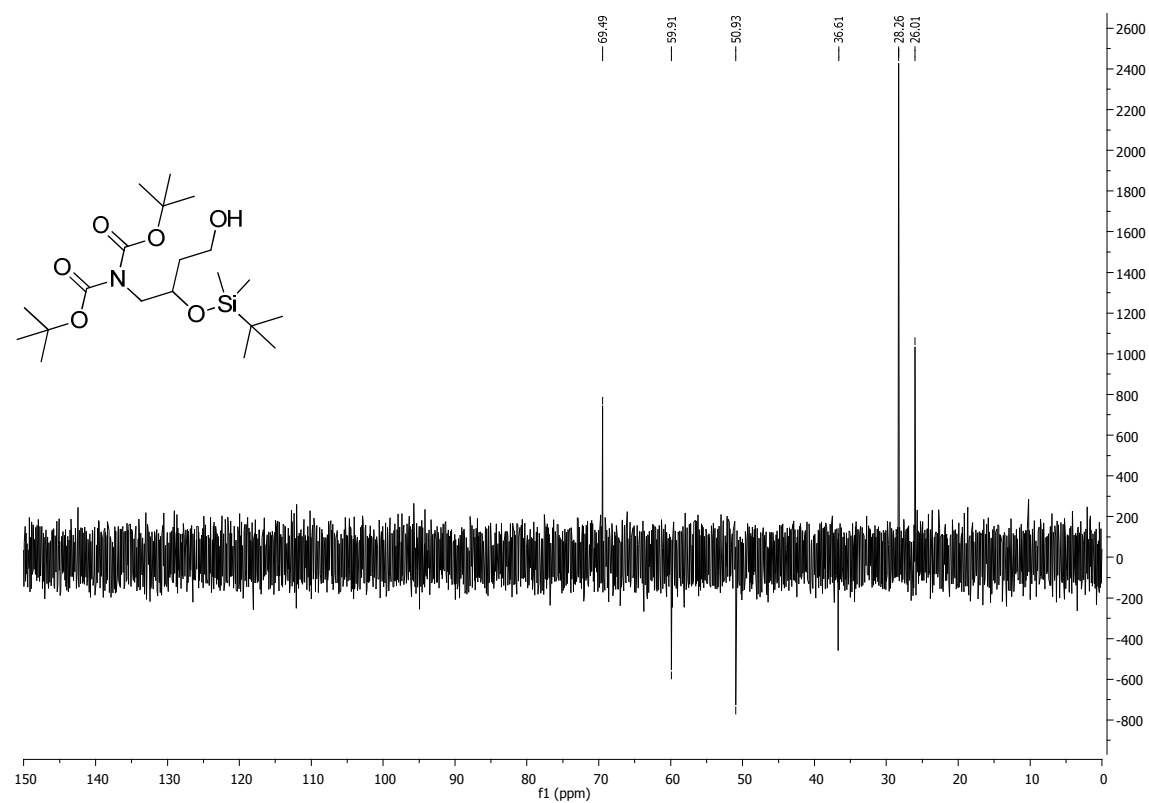


Abbildung 212: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Alkohols 179j.

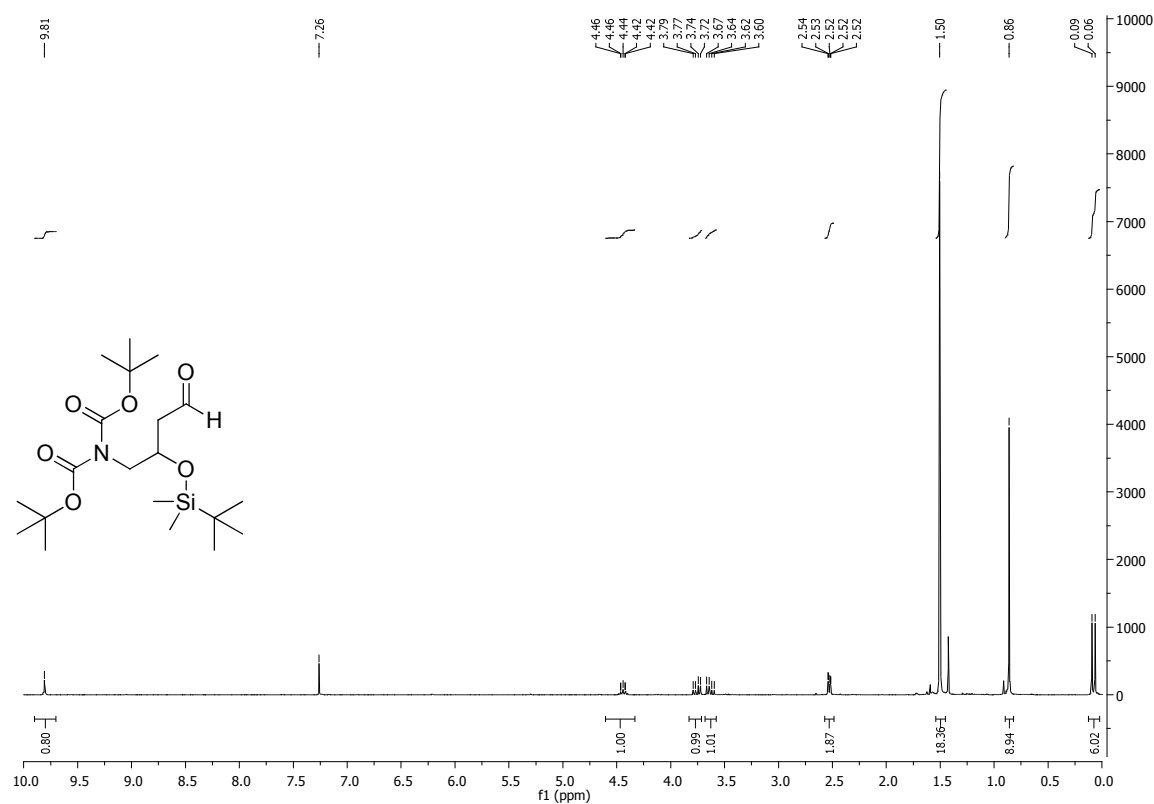


Abbildung 213: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Aldehyds 181.

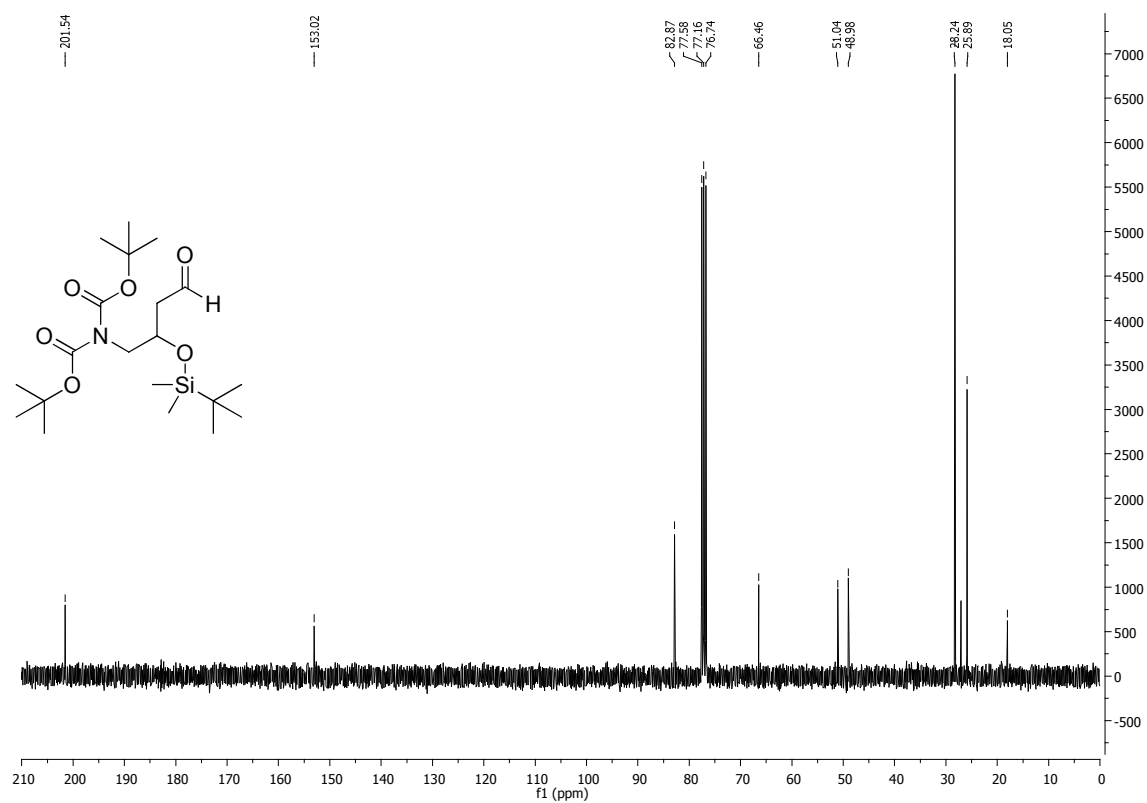


Abbildung 214: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Aldehyds **181**.

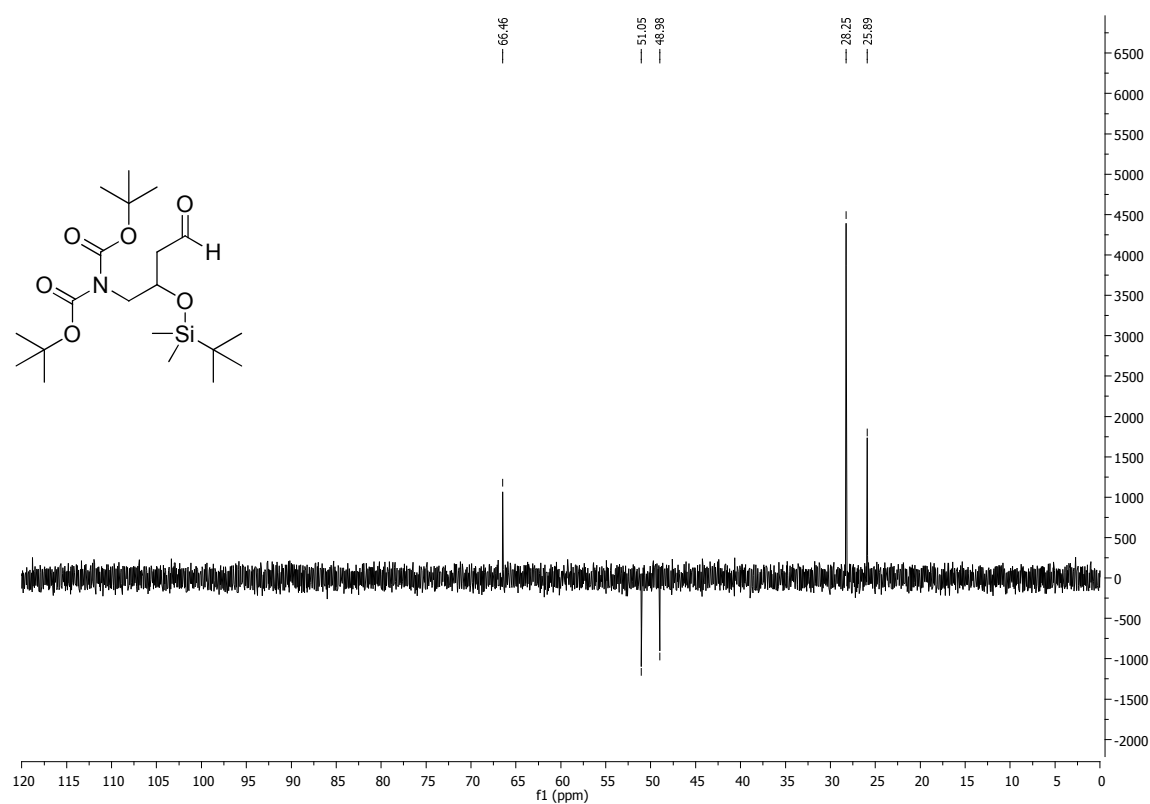


Abbildung 215: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Aldehyds **181**.

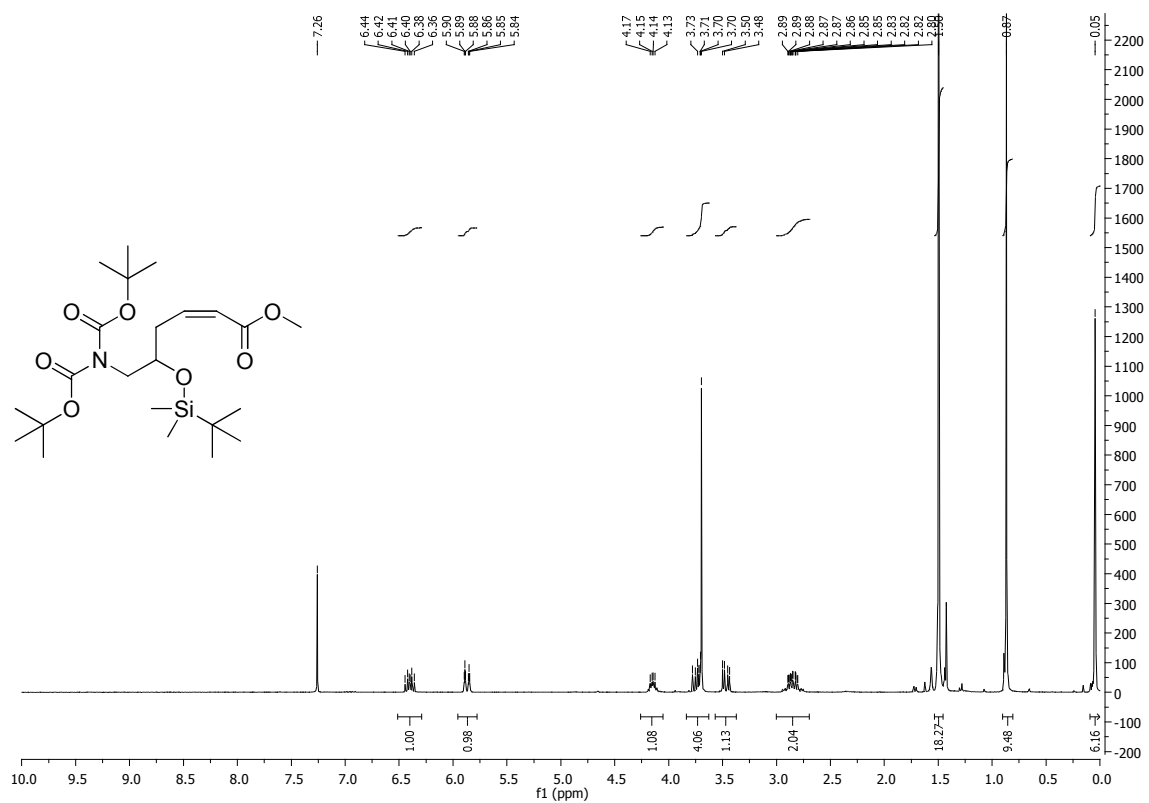


Abbildung 216: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Methylesters **182a**.

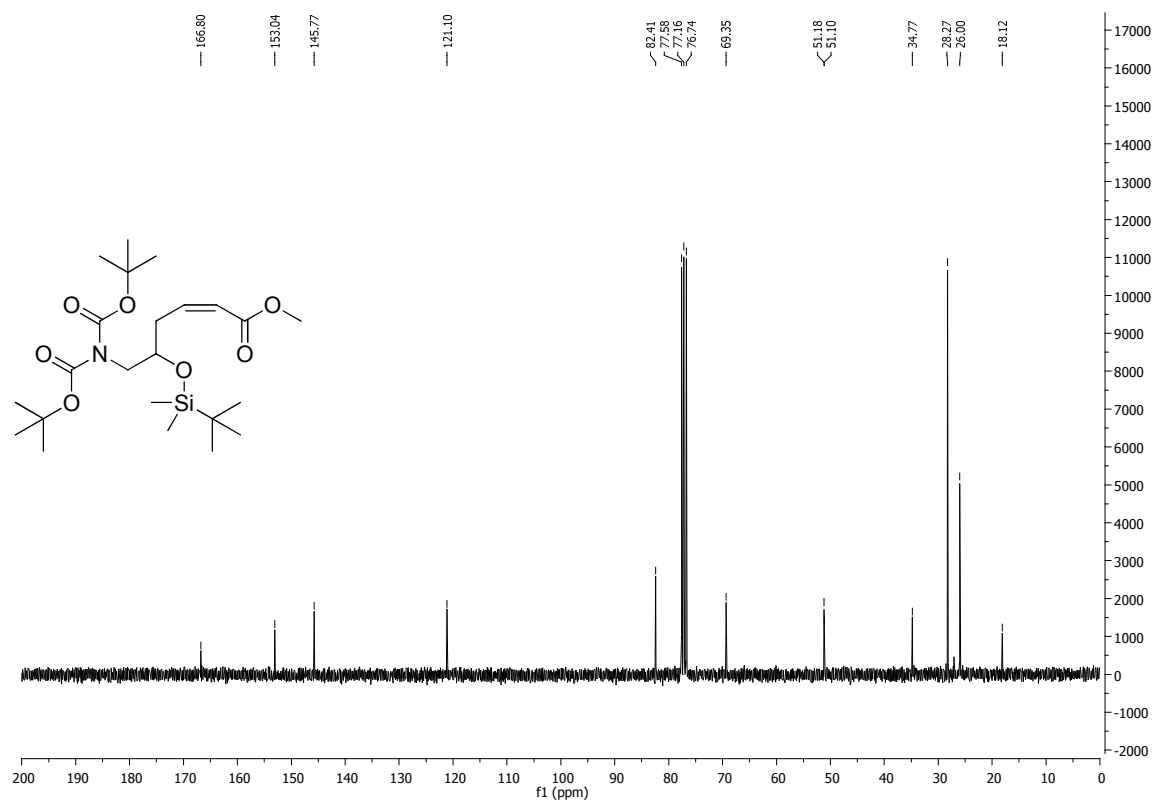
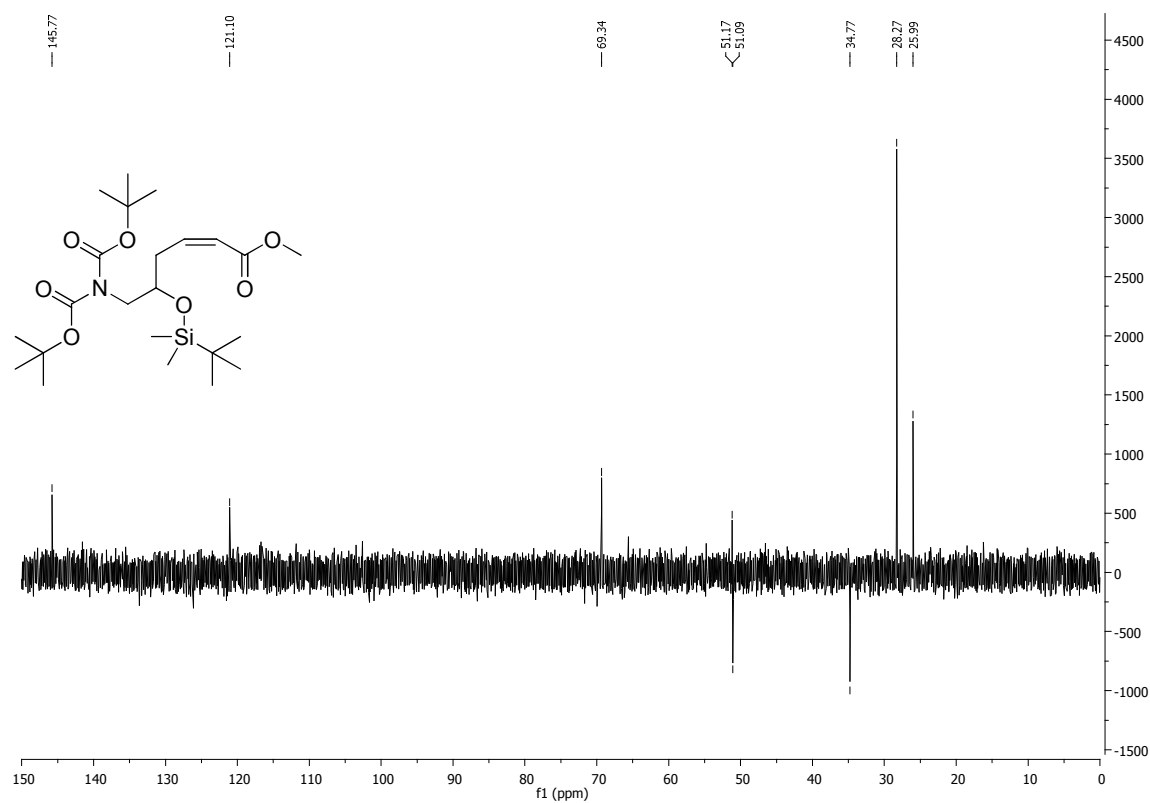
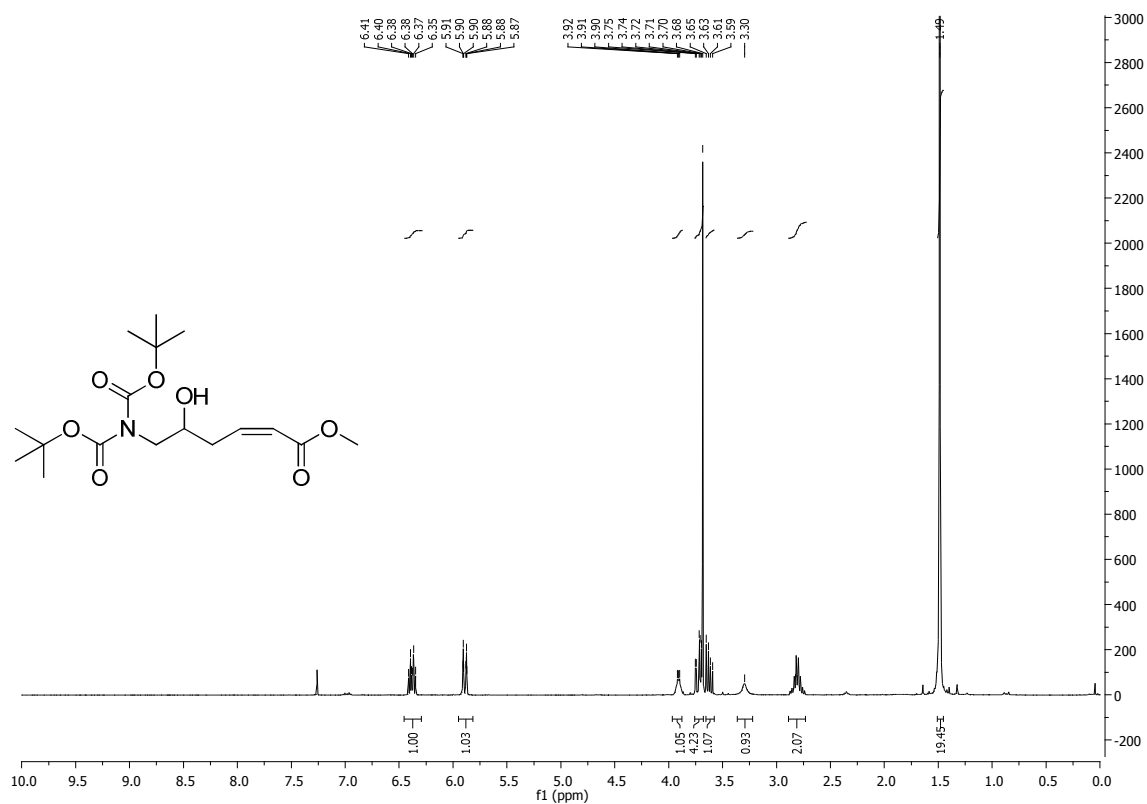


Abbildung 217: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Methylesters **182a**.

Abbildung 218: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Methylesters **182a**.Abbildung 219: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Alkohols **182b**.

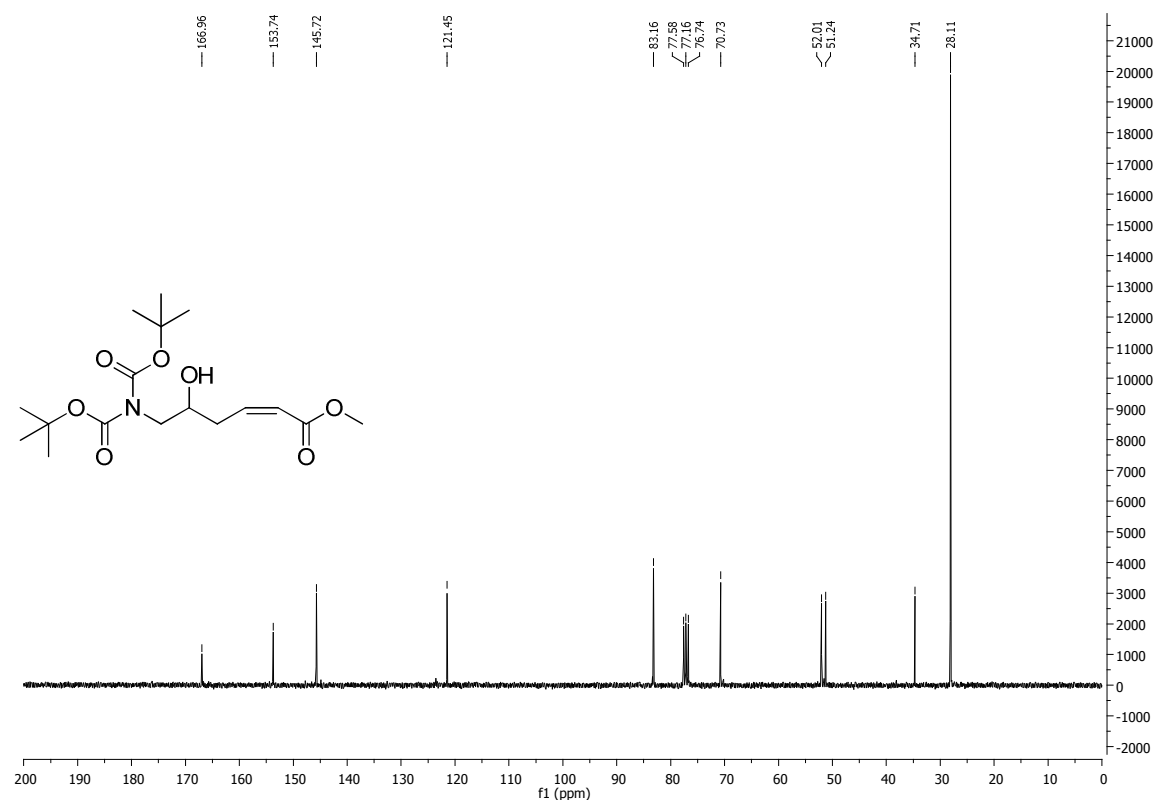


Abbildung 220: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Alkohols 182b.

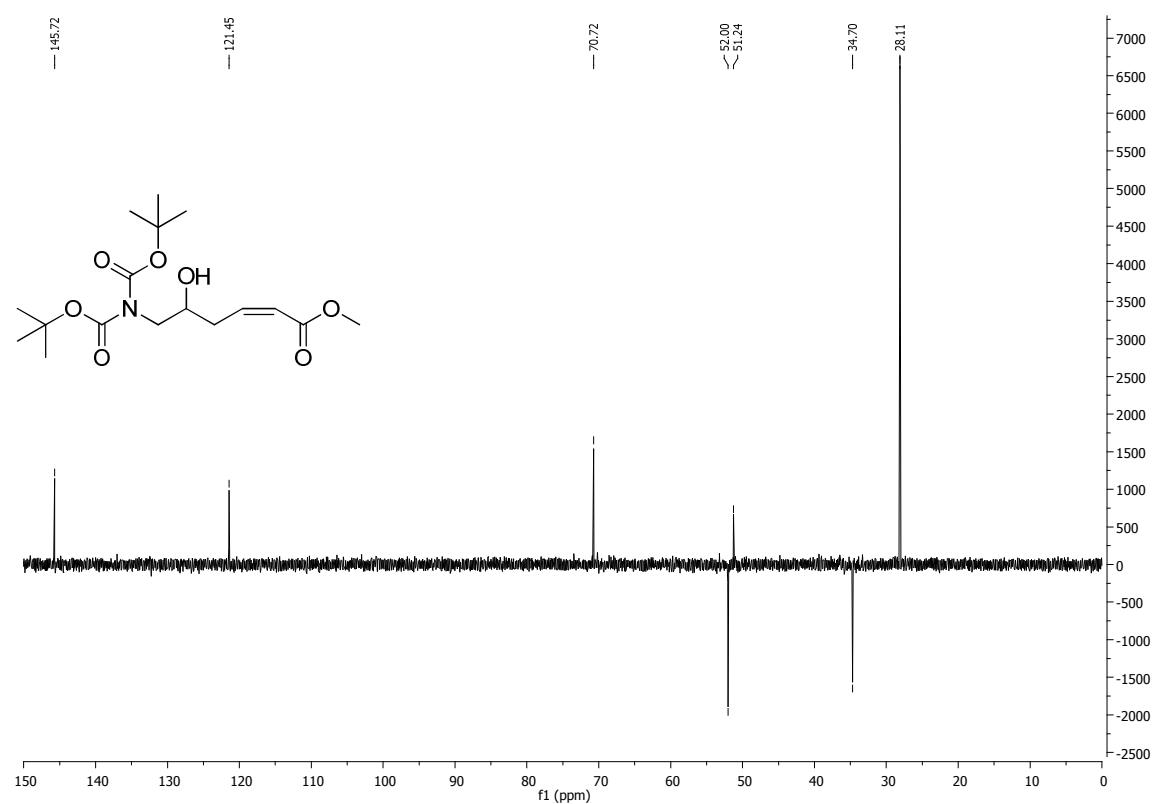
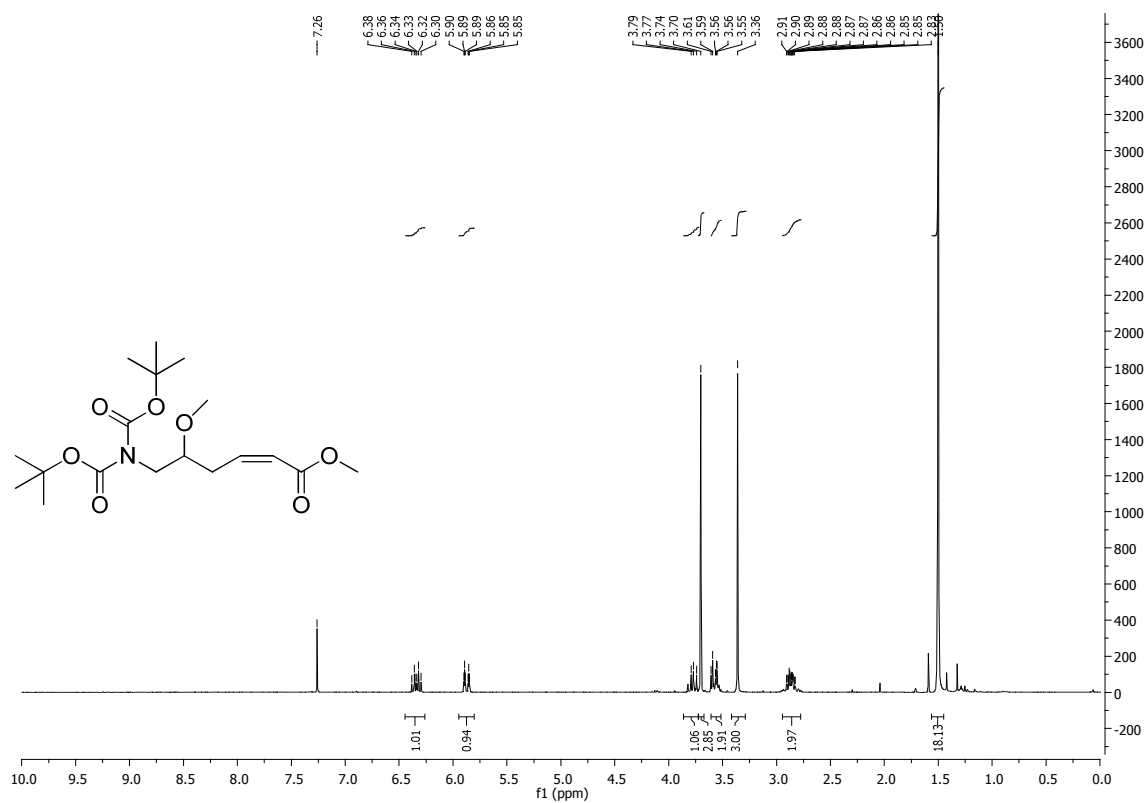
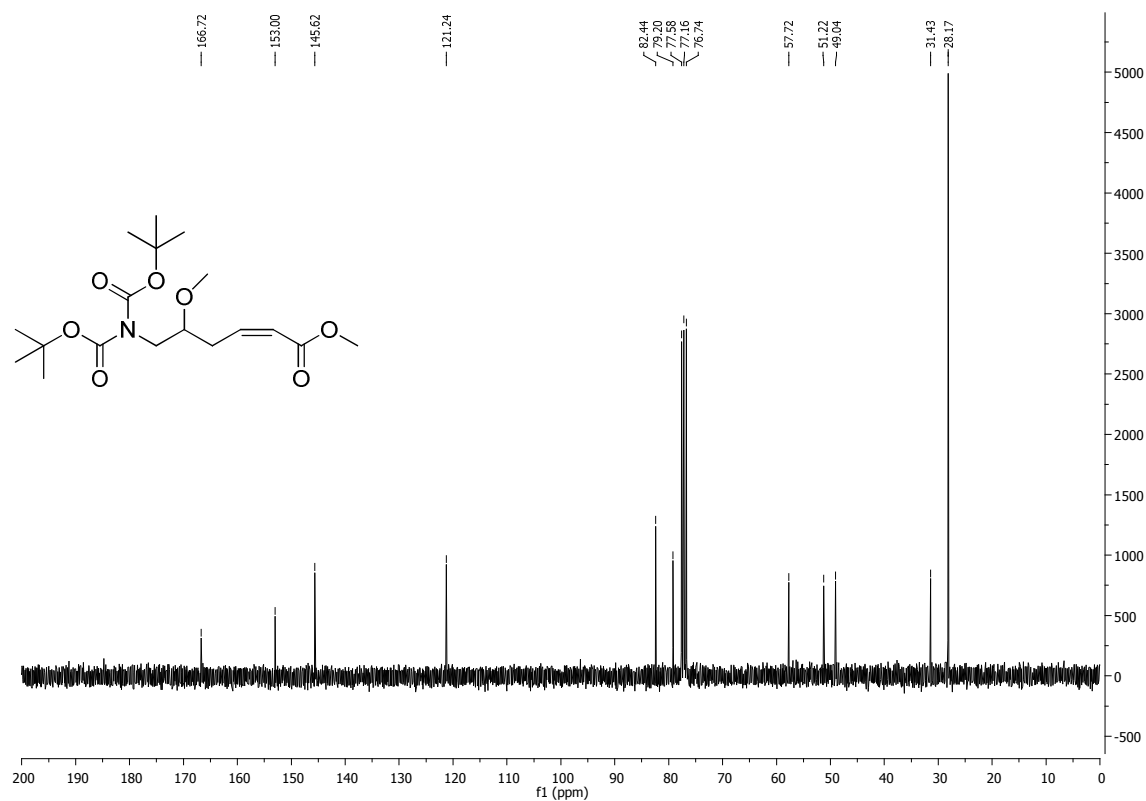
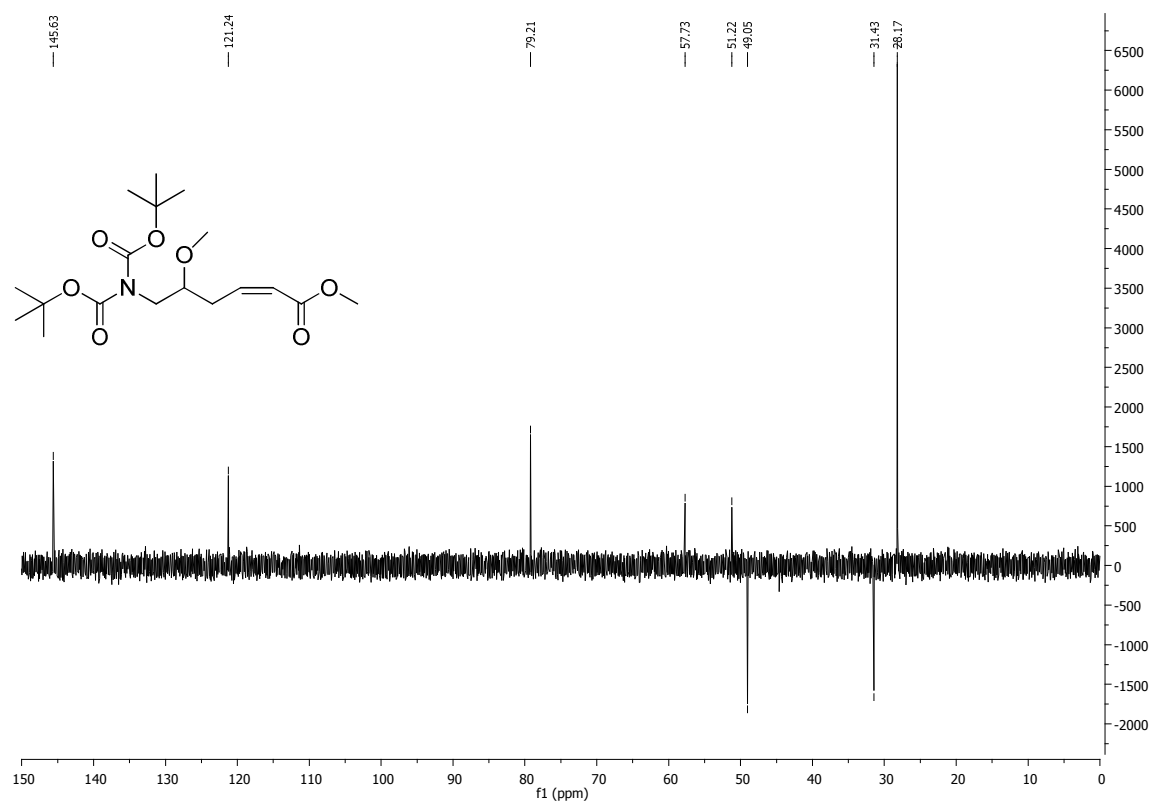
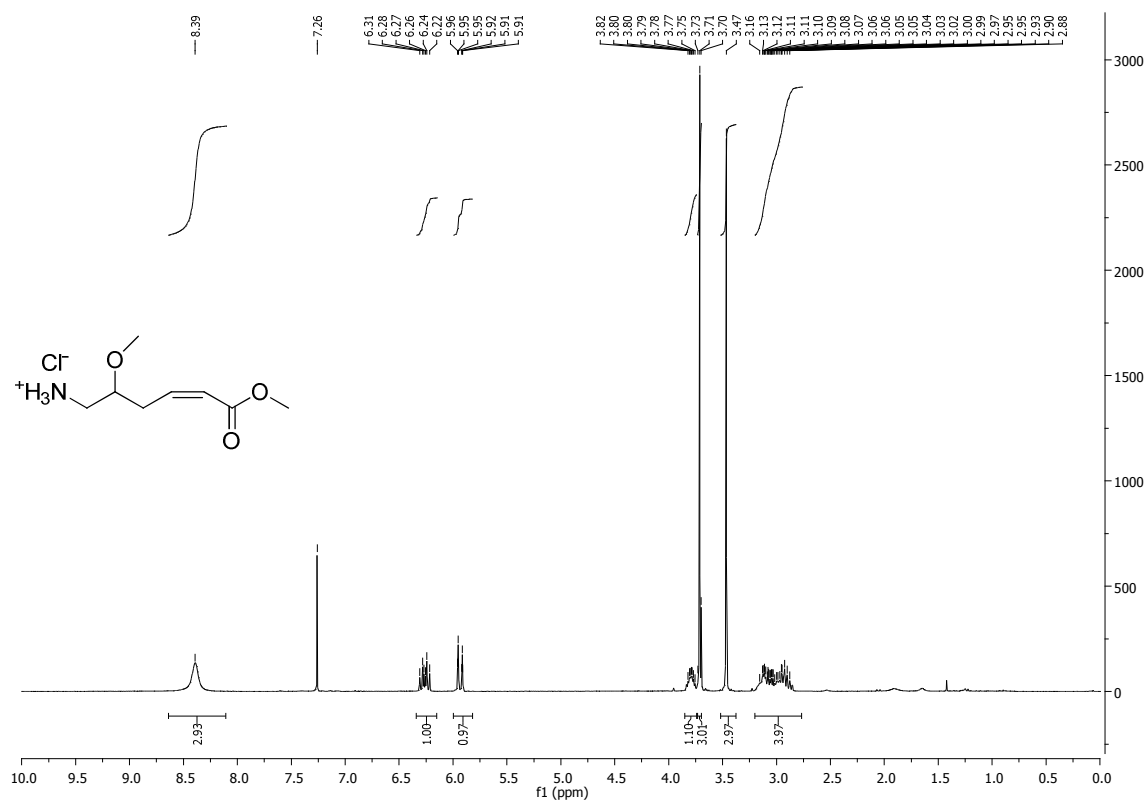


Abbildung 221: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Alkohols 182b.

Abbildung 222: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Methylethers **182c**.Abbildung 223: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Methylethers **182c**.

Abbildung 224: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Methylethers **182c**.Abbildung 225: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Hydrochlorids **182d**.

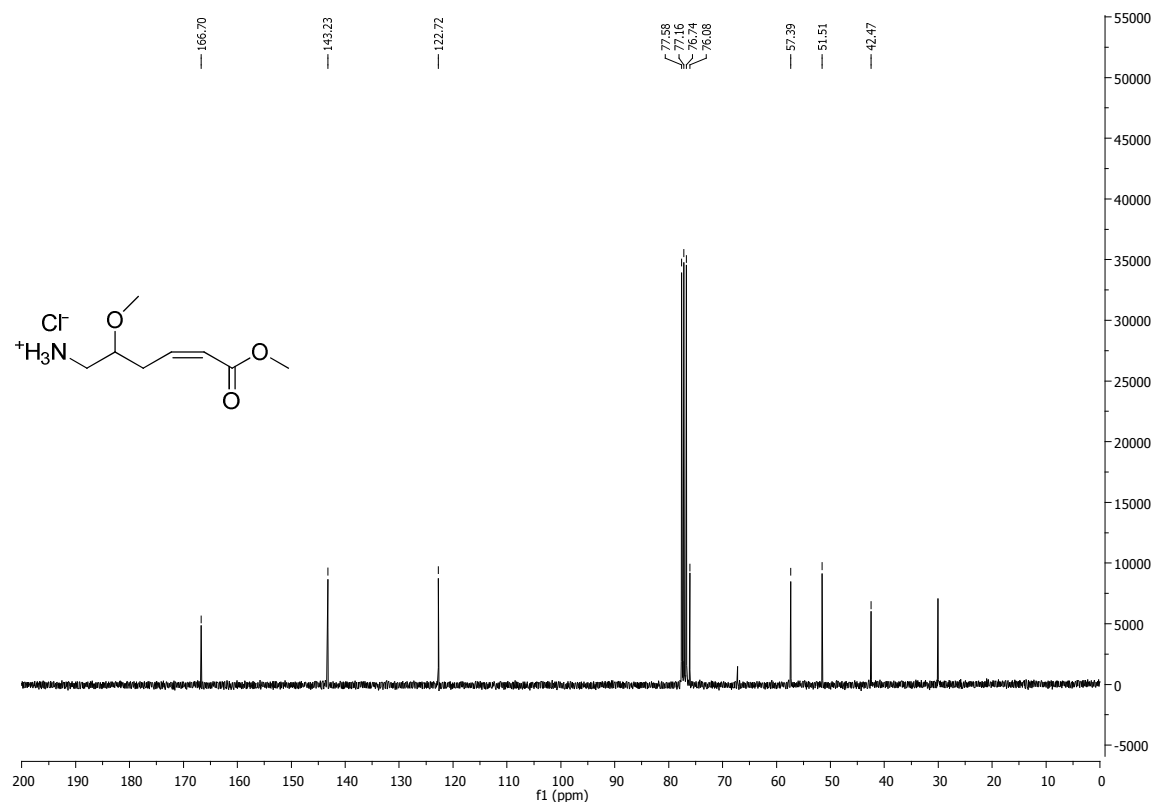


Abbildung 226: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Hydrochlorids **182d**.

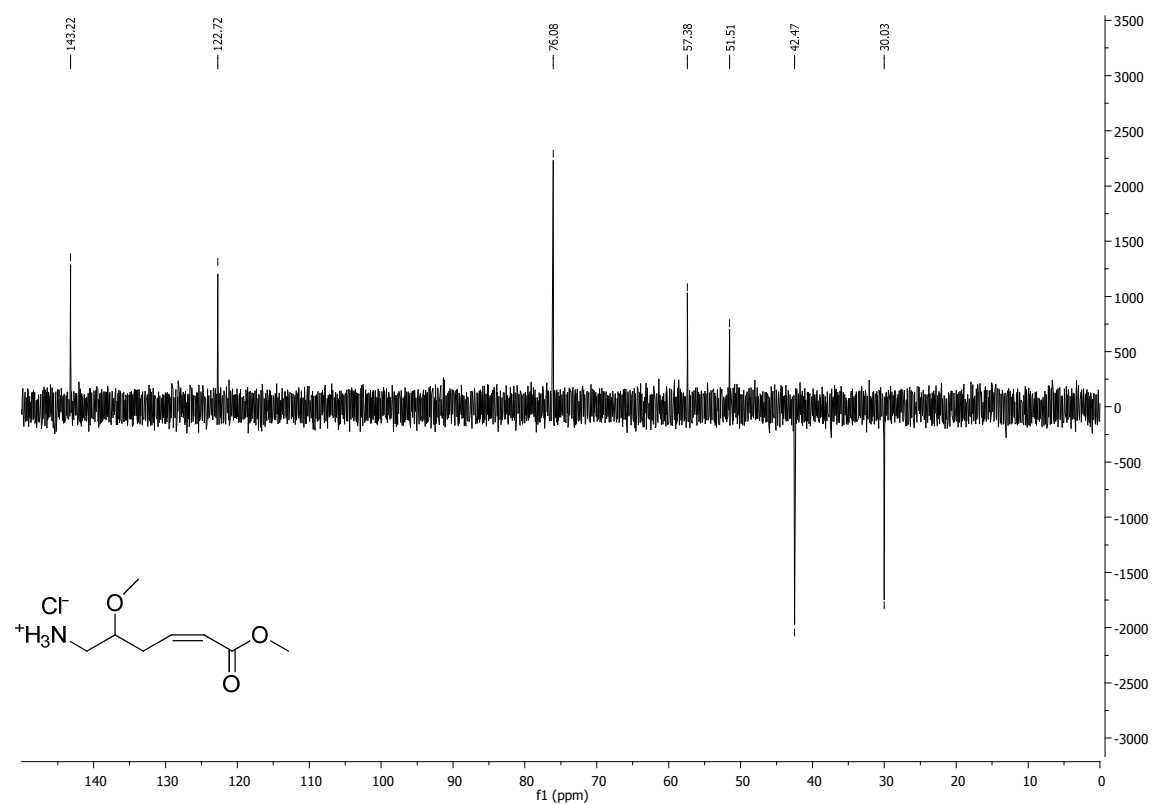
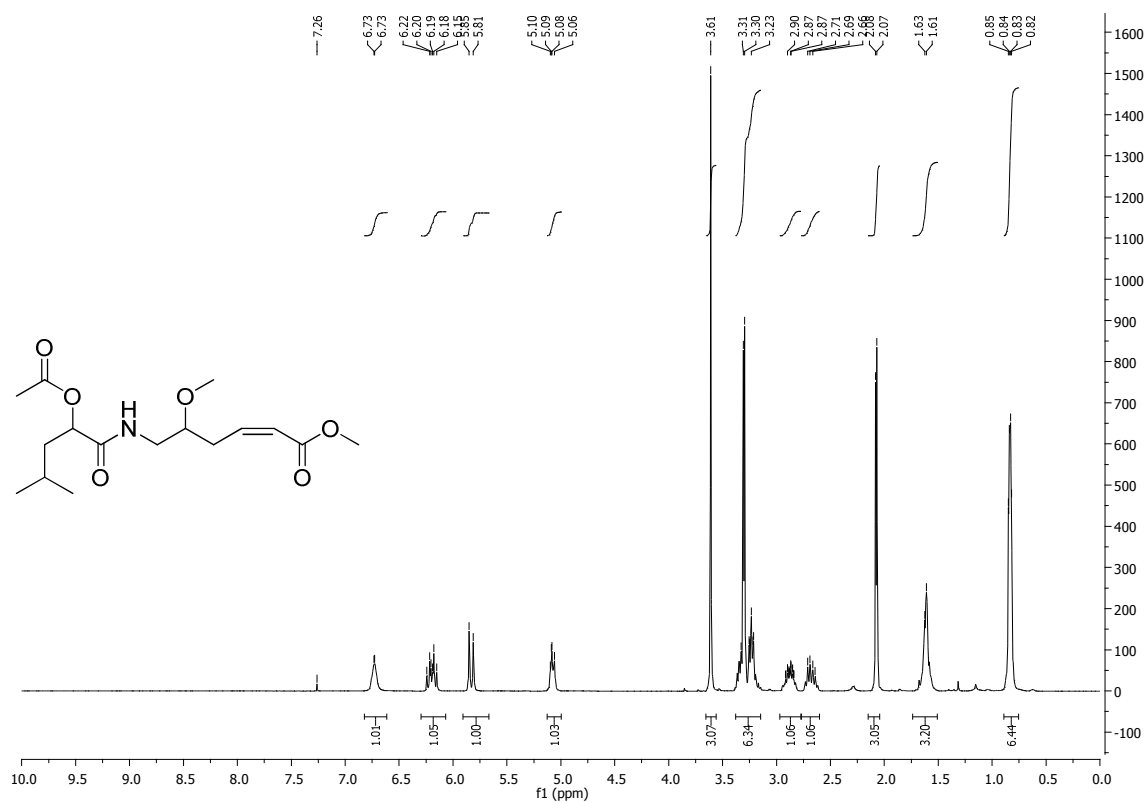
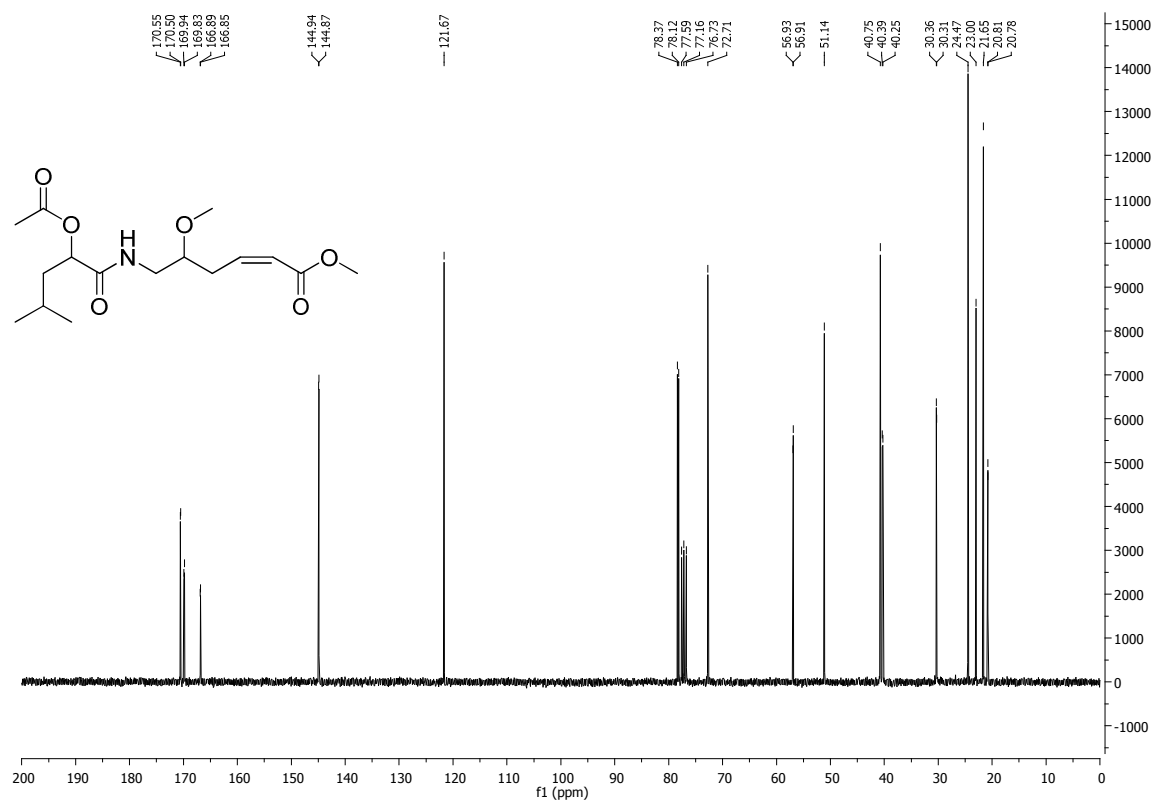
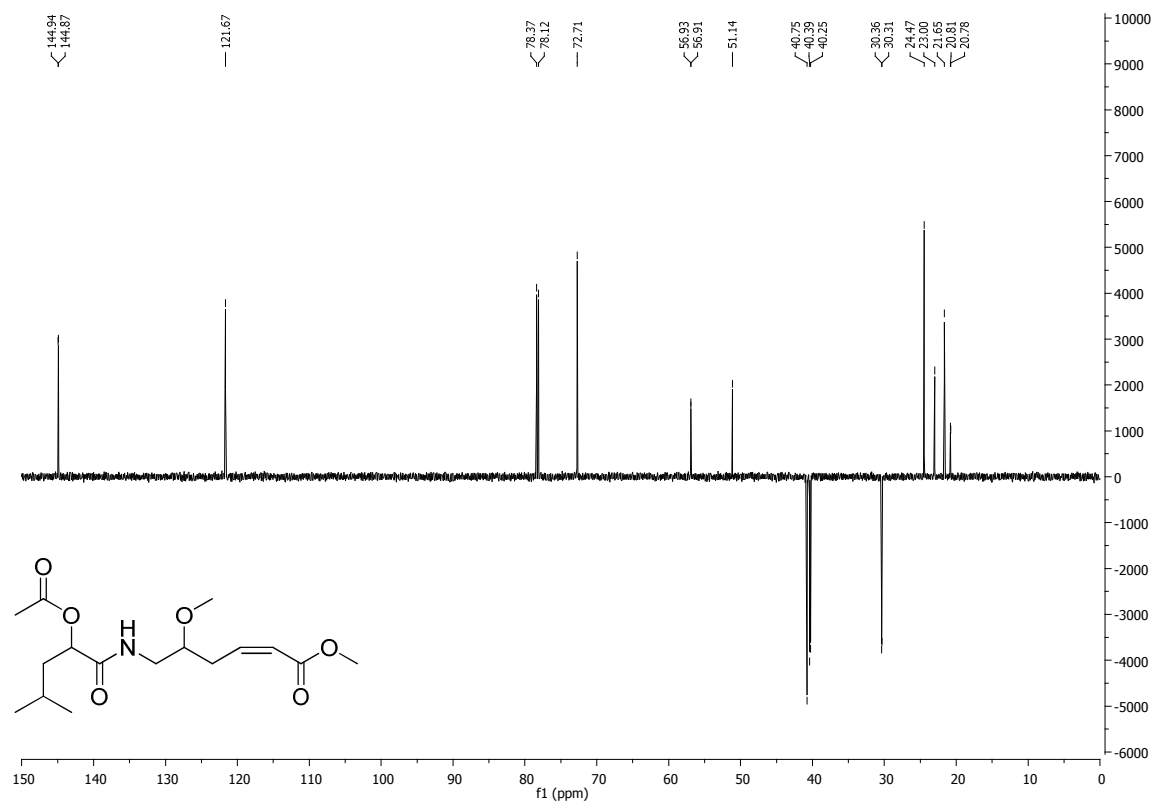
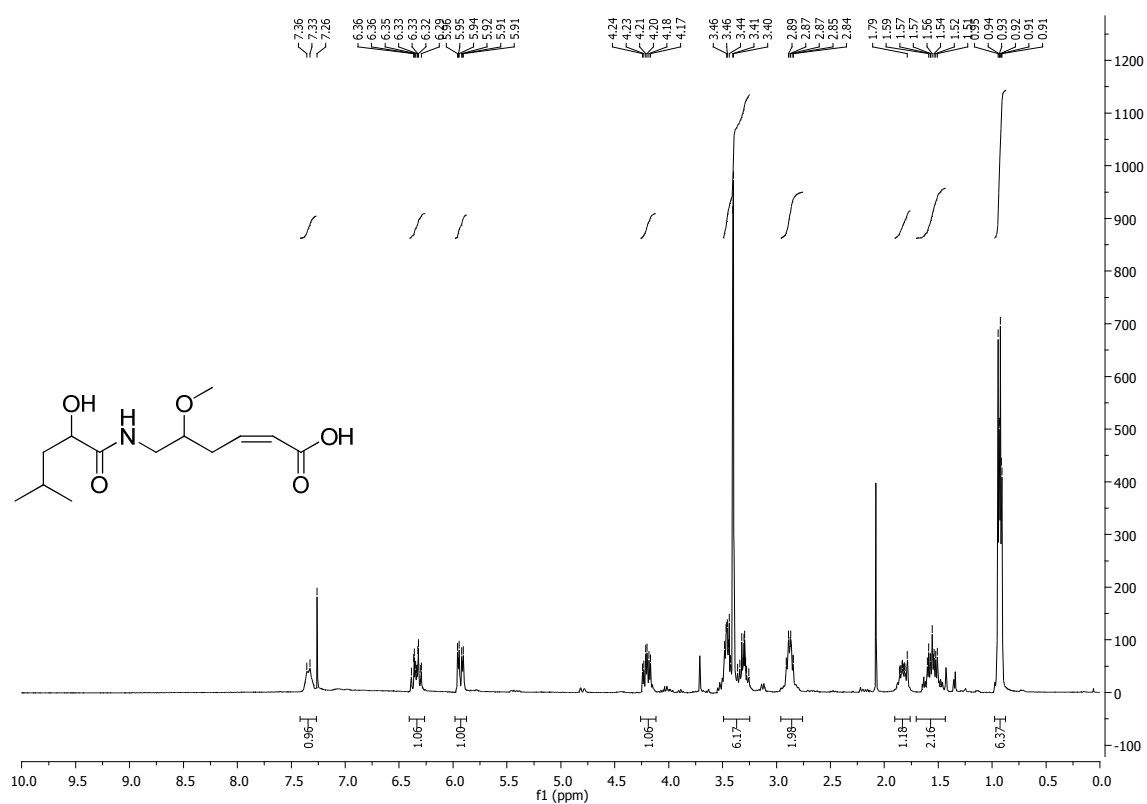


Abbildung 227: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Hydrochlorids **182d**.

Abbildung 228: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Amids 183a.Abbildung 229: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Amids 183a.

Abbildung 230: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Amids **183a**.Abbildung 231: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure **183b**.

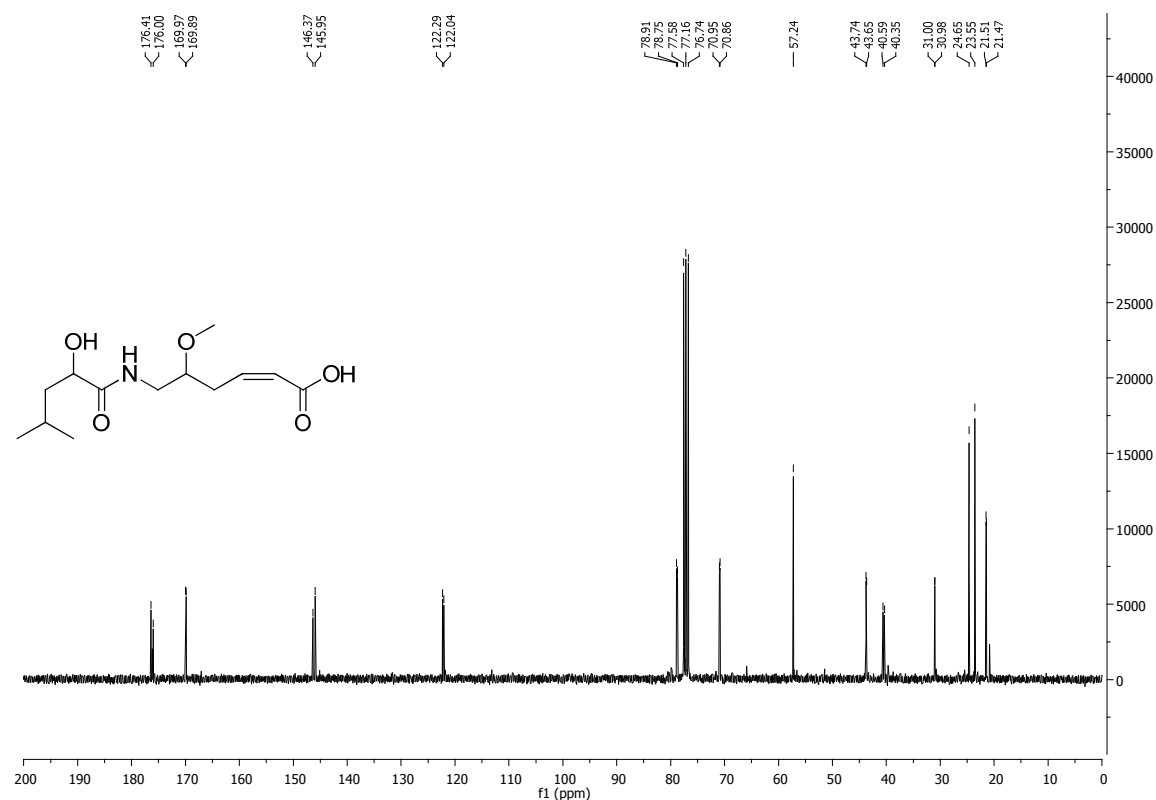
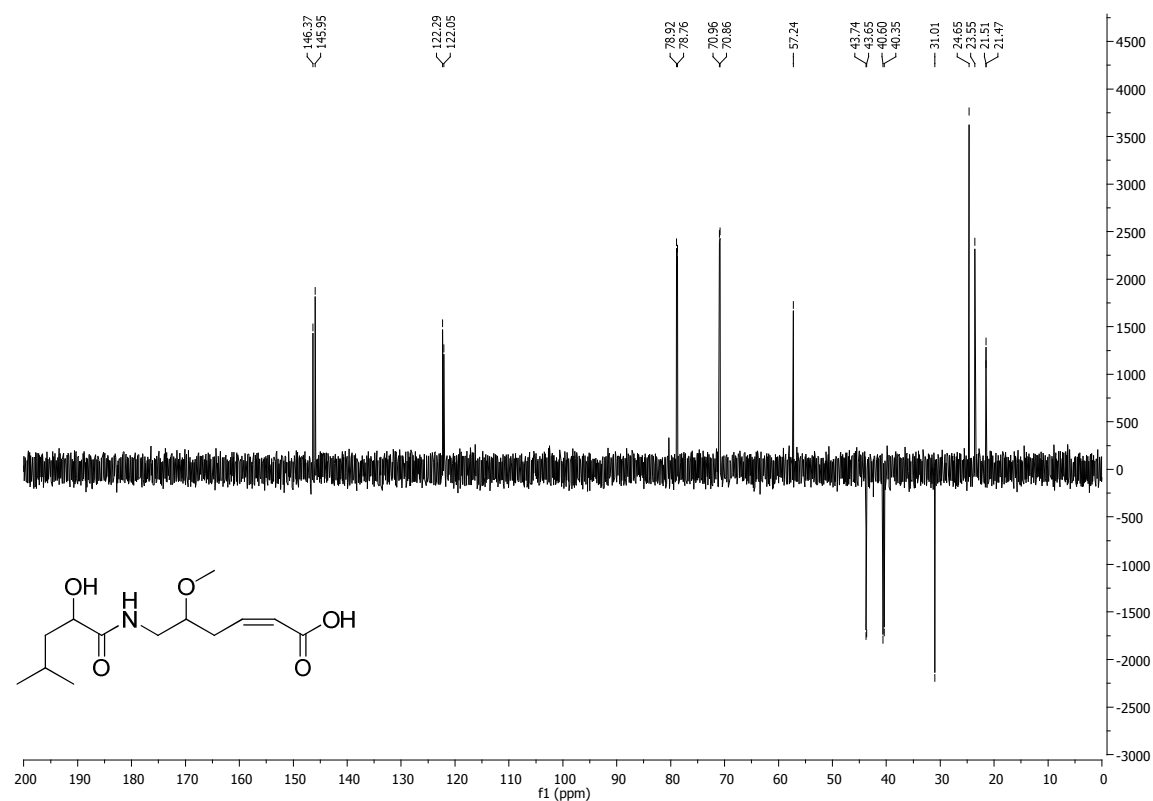
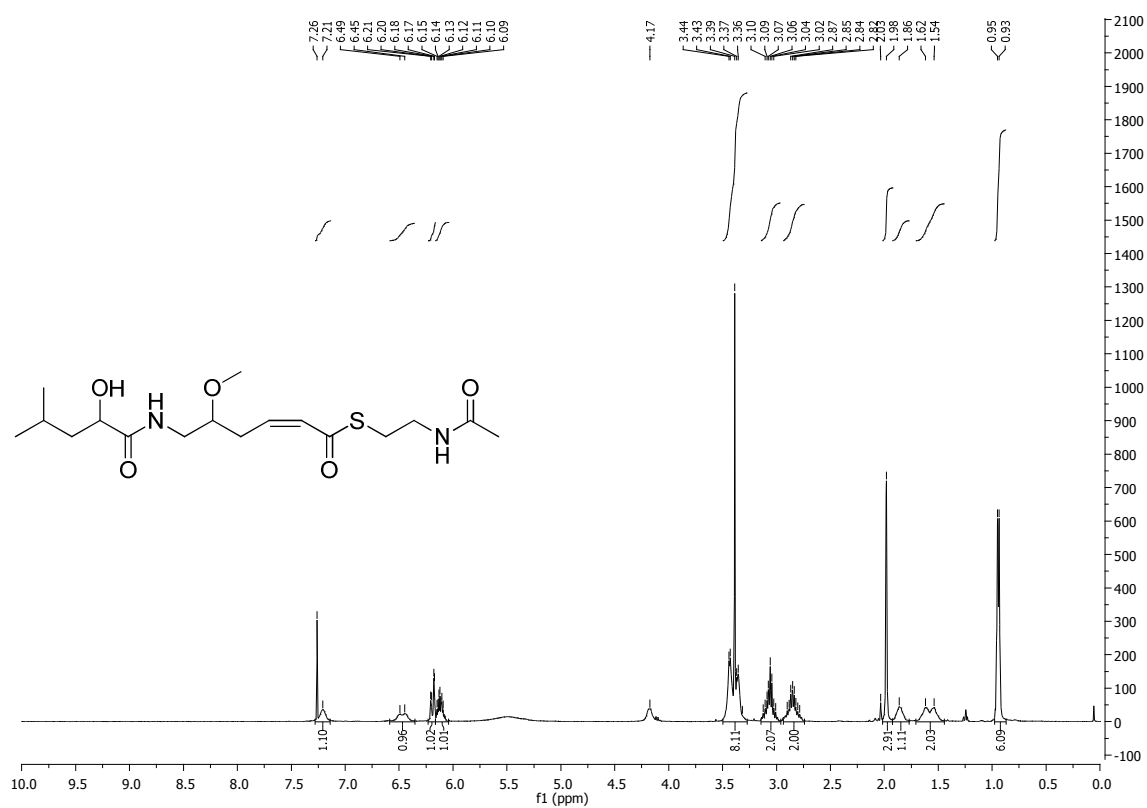
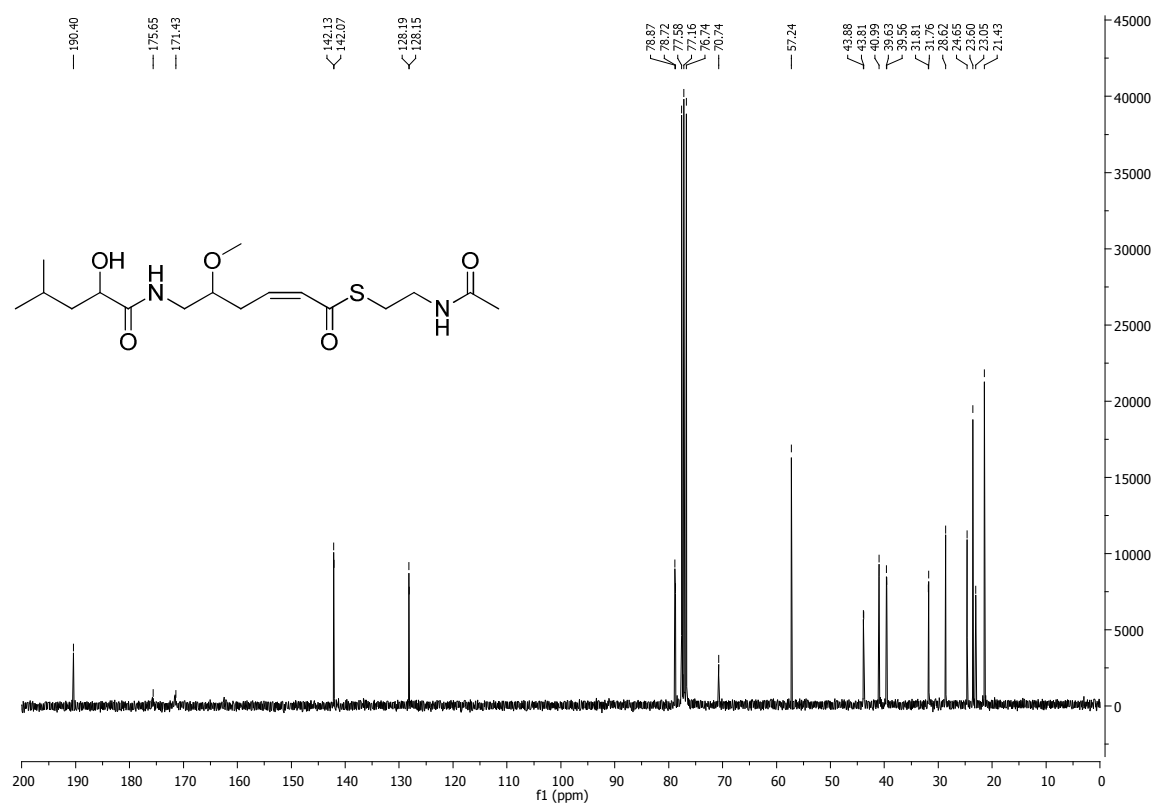
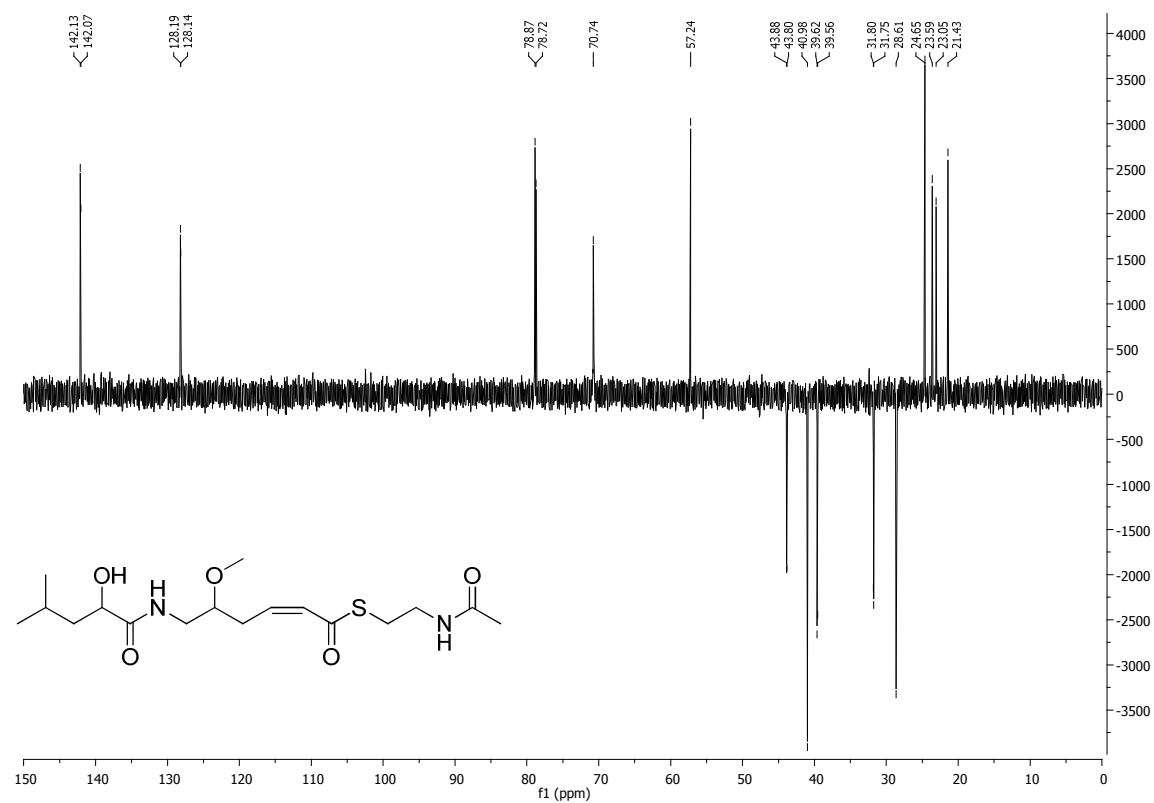
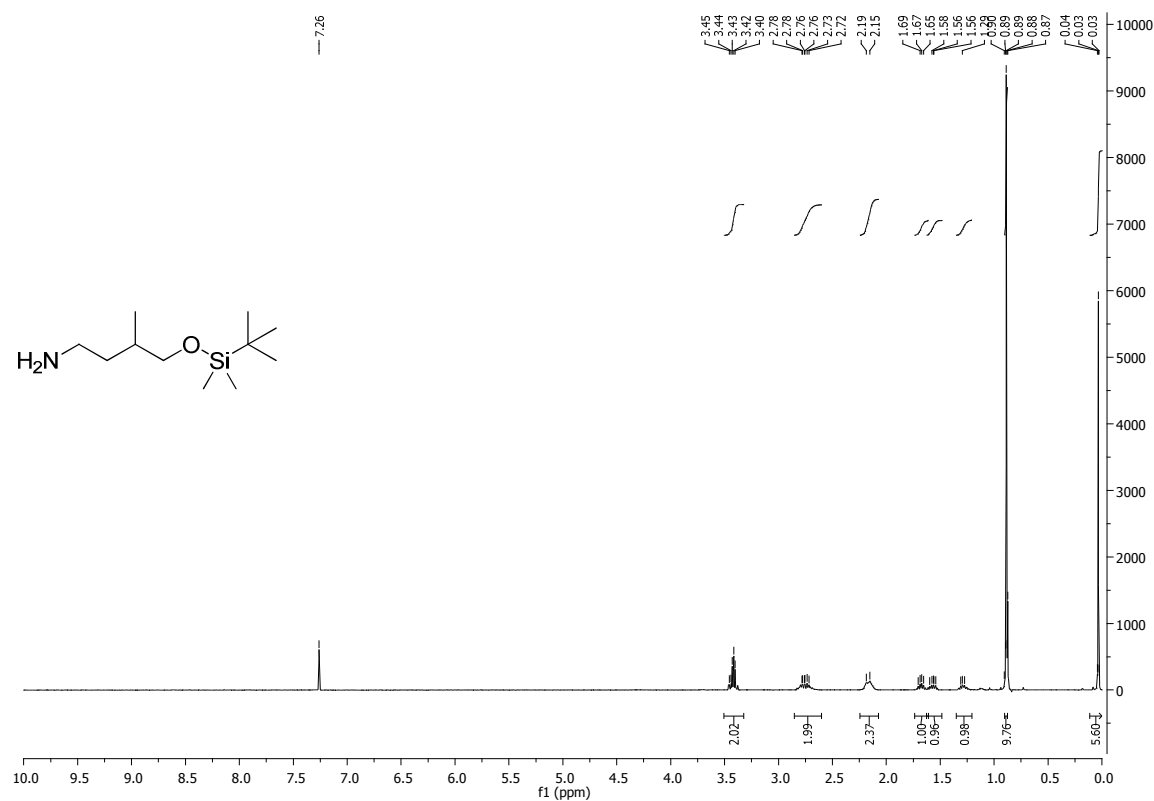
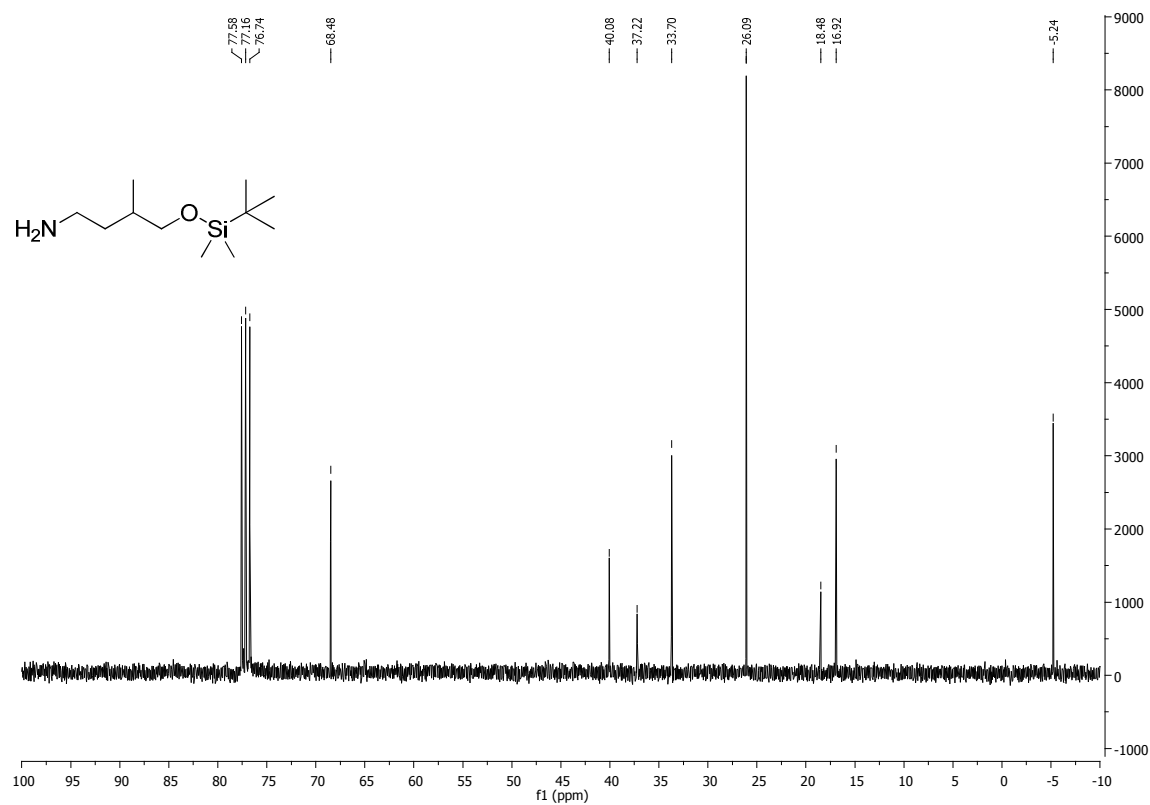
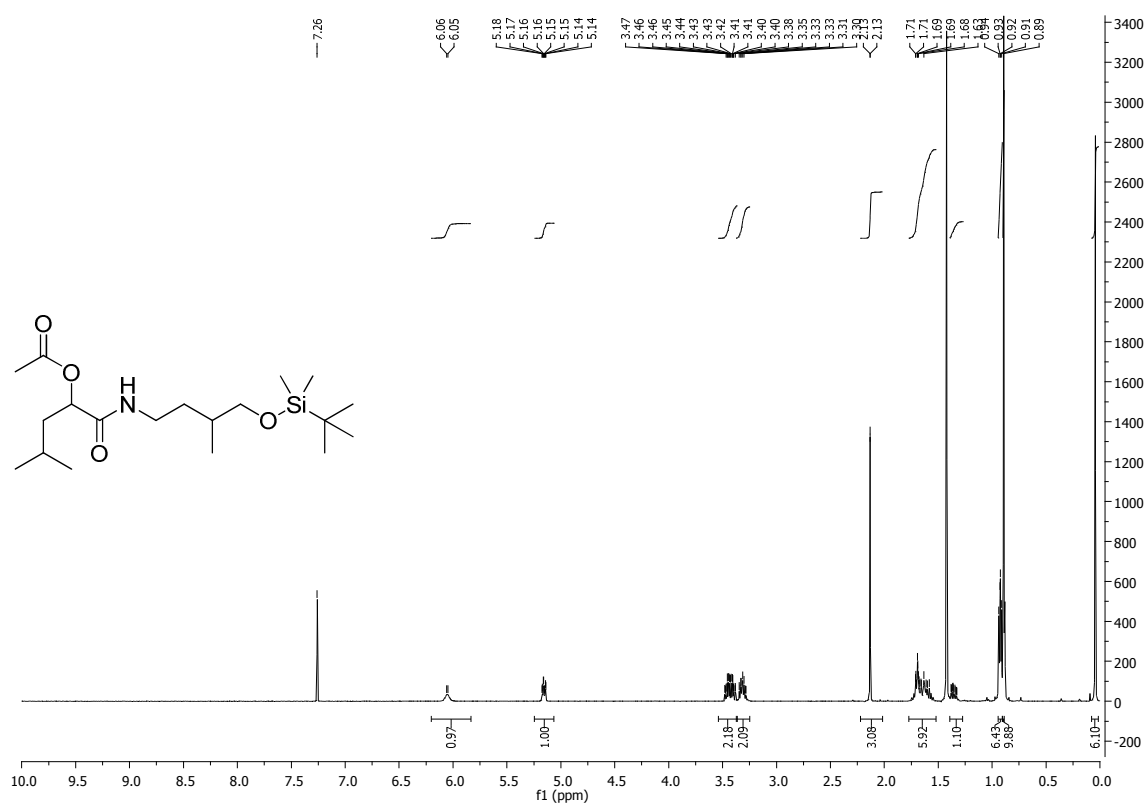
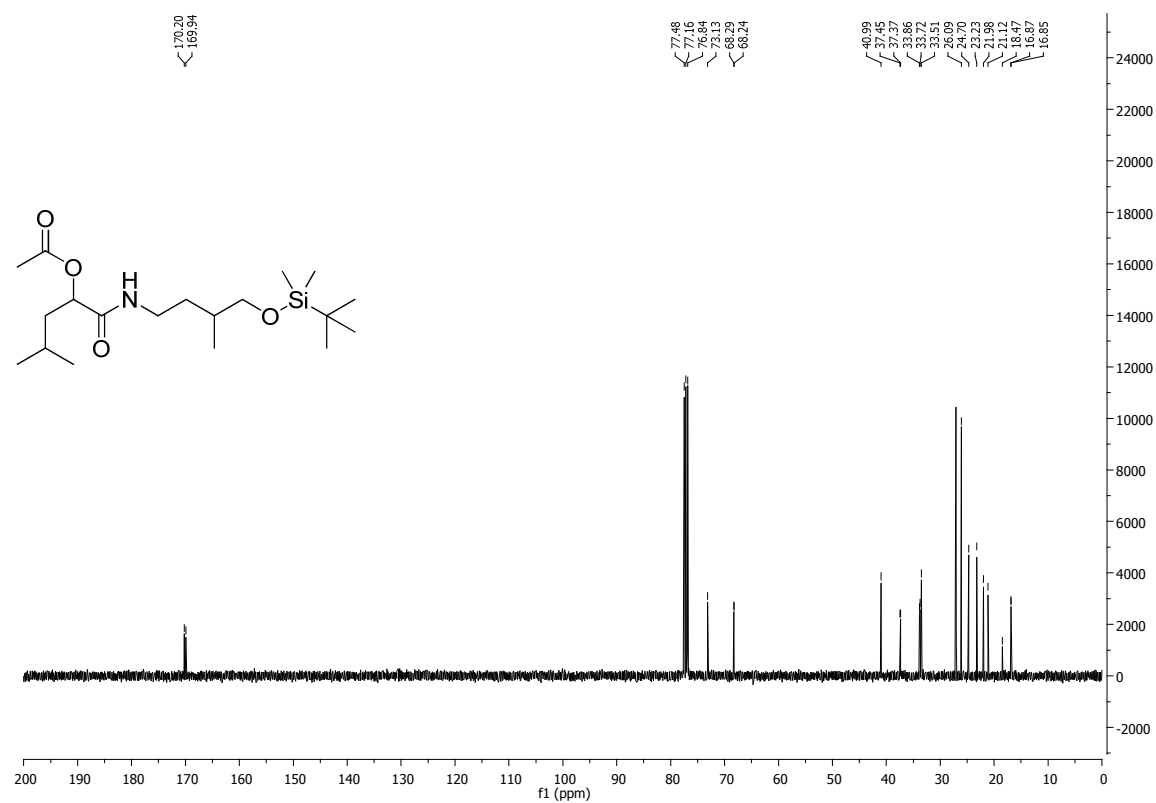
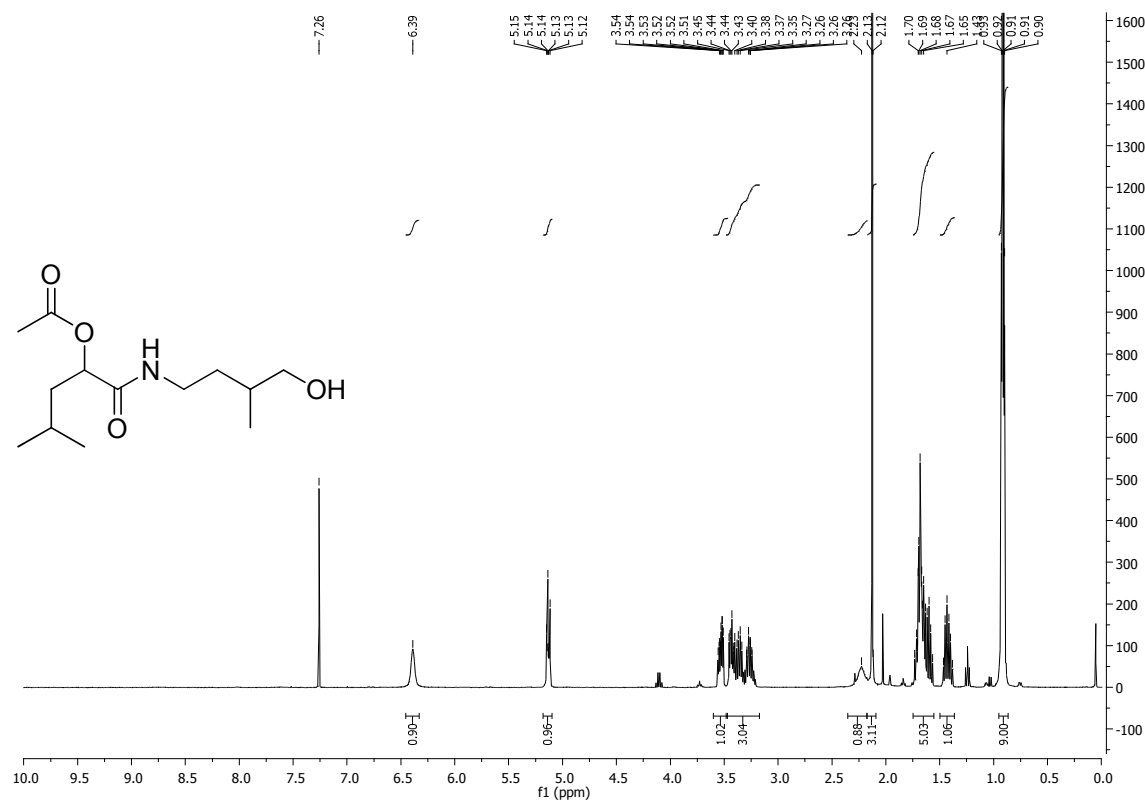
Abbildung 232: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) der Säure 183b.

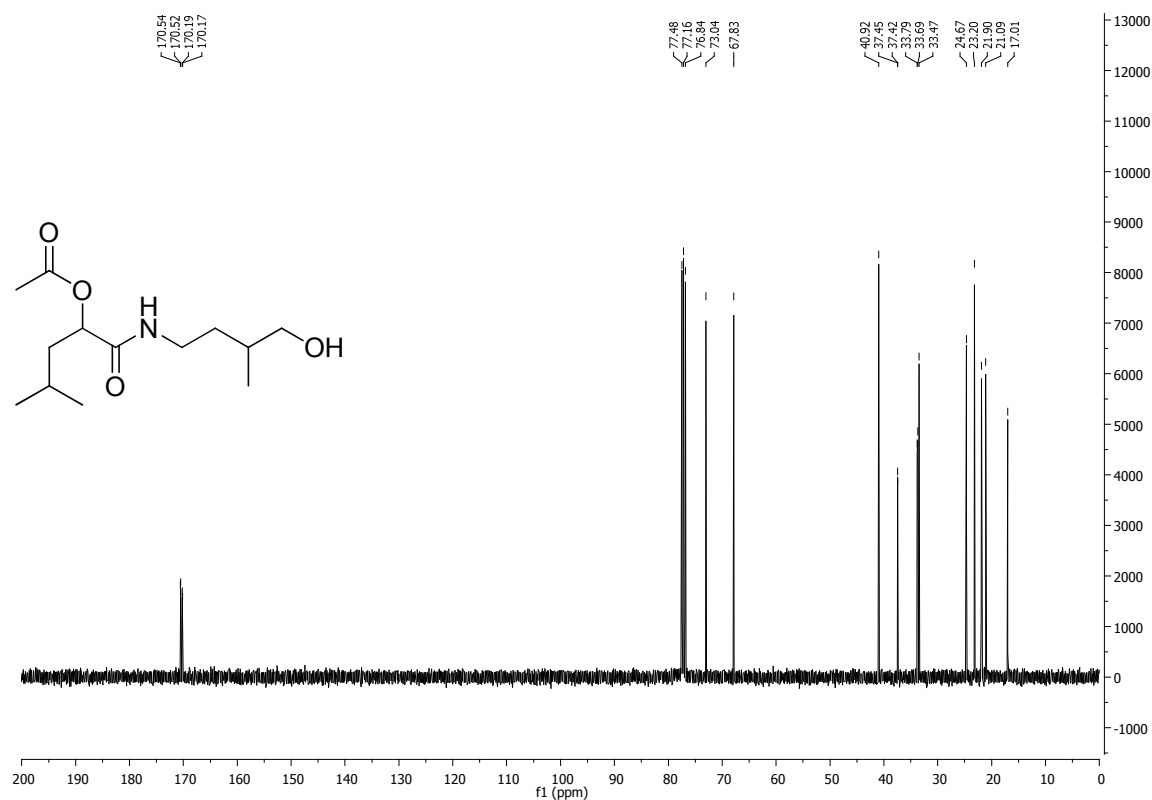
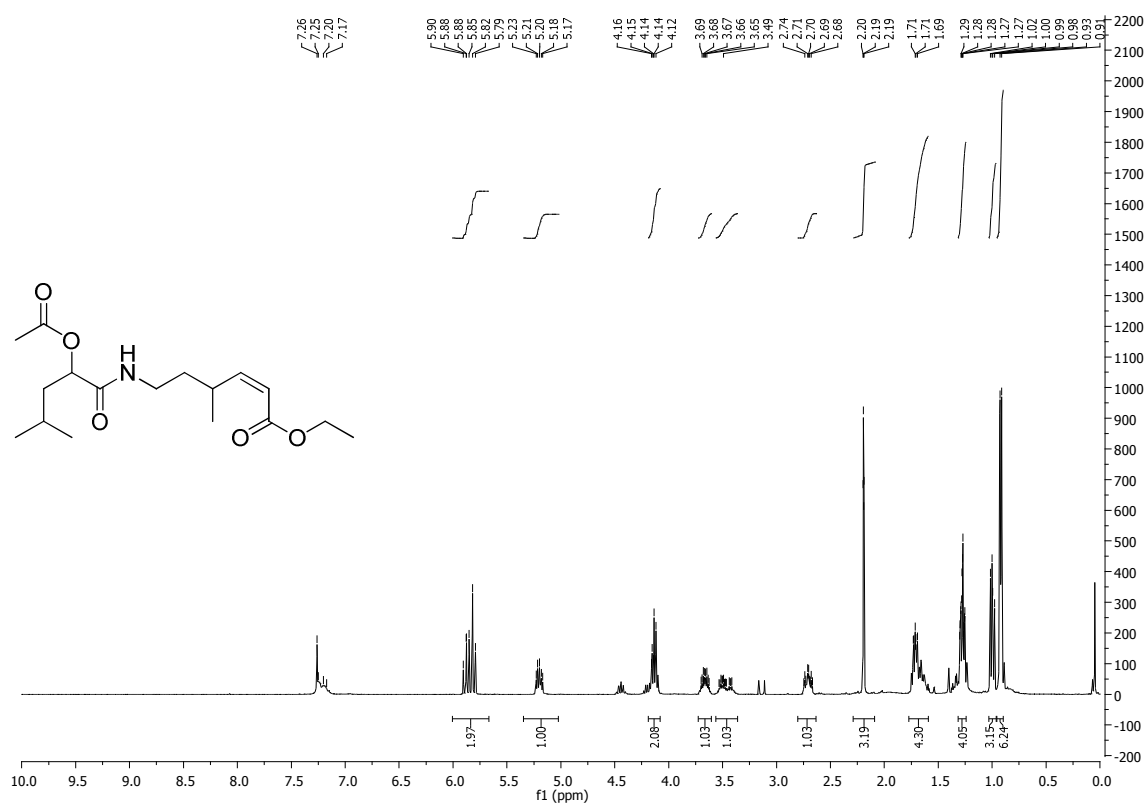
Abbildung 233: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) der Säure 183b.

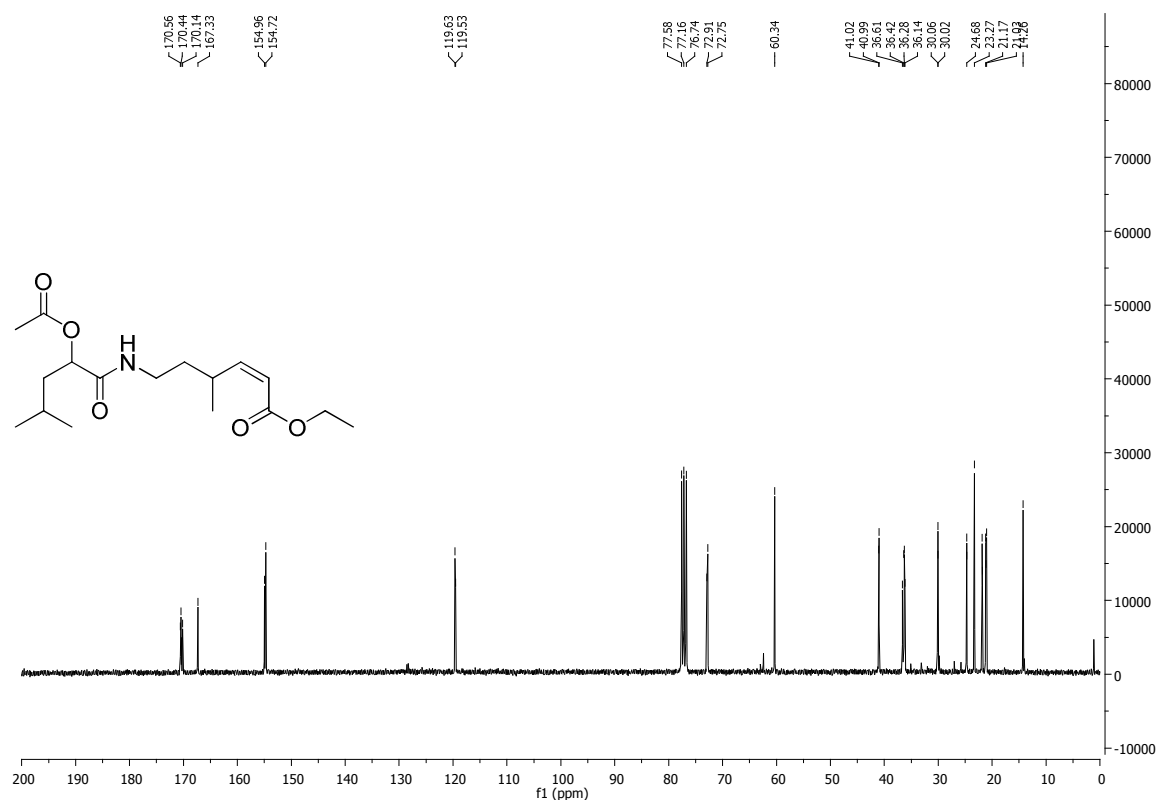
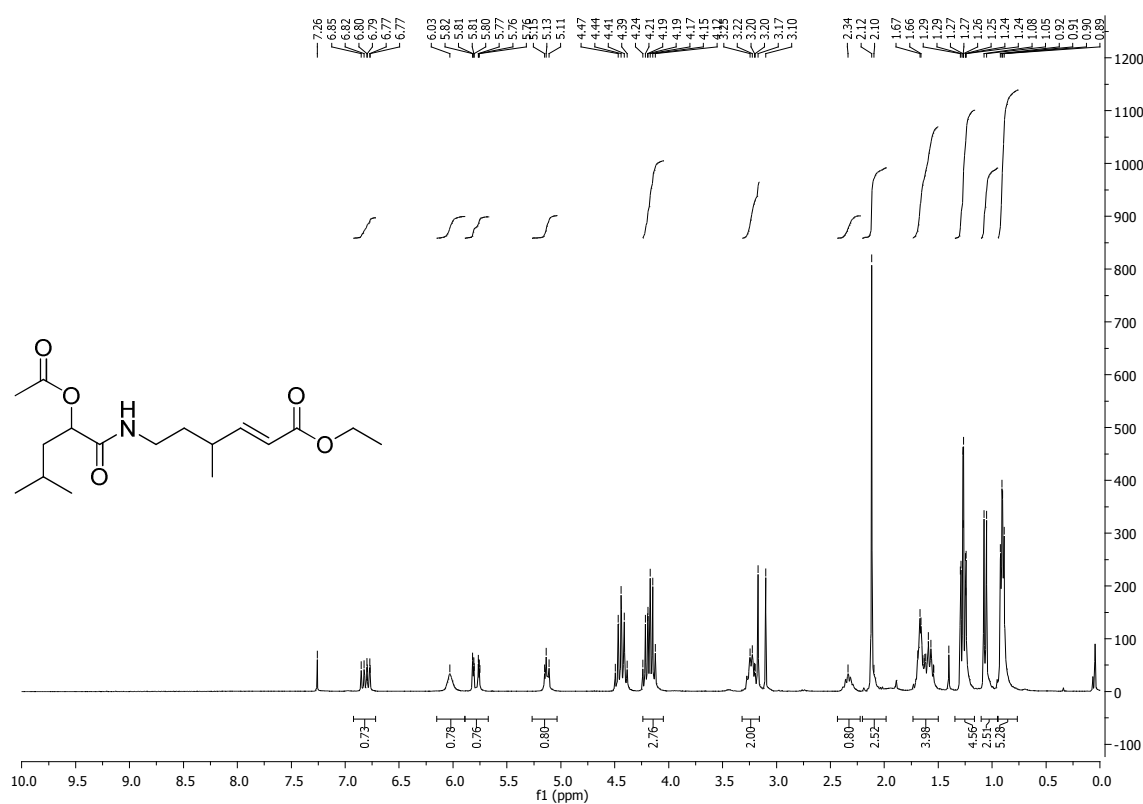
Abbildung 234: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 79.Abbildung 235: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 79.

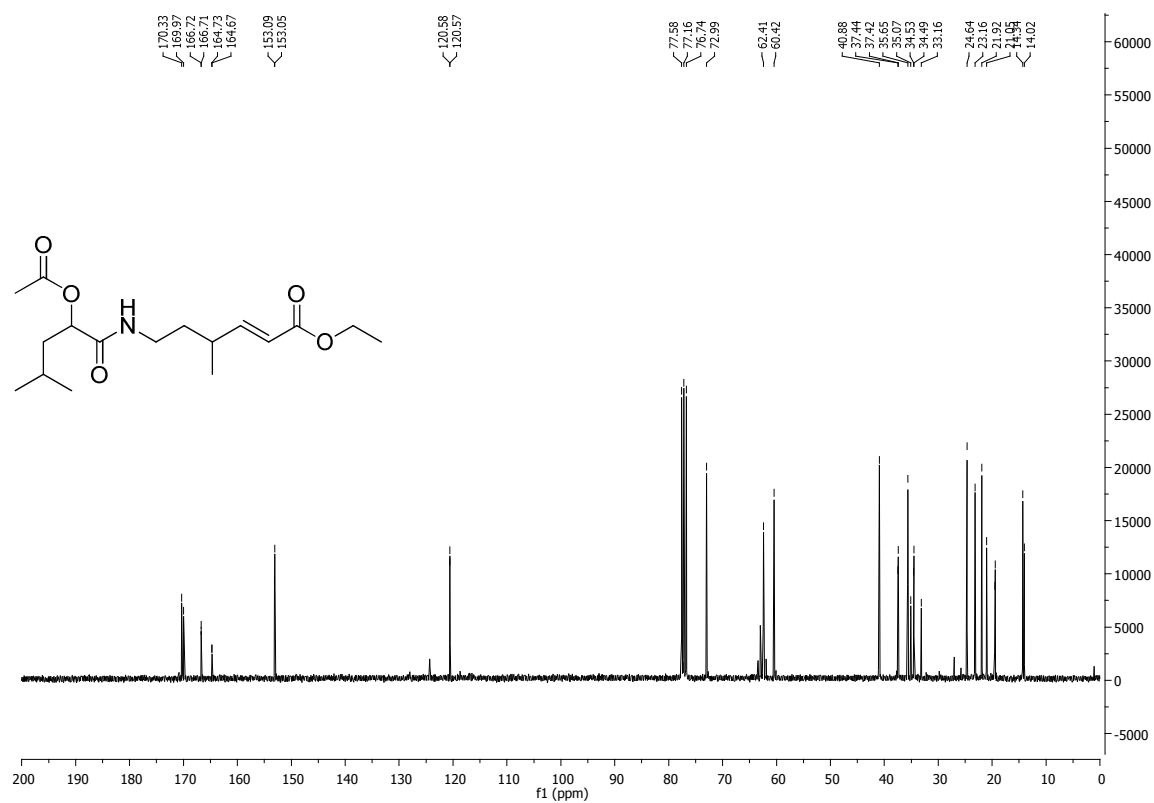
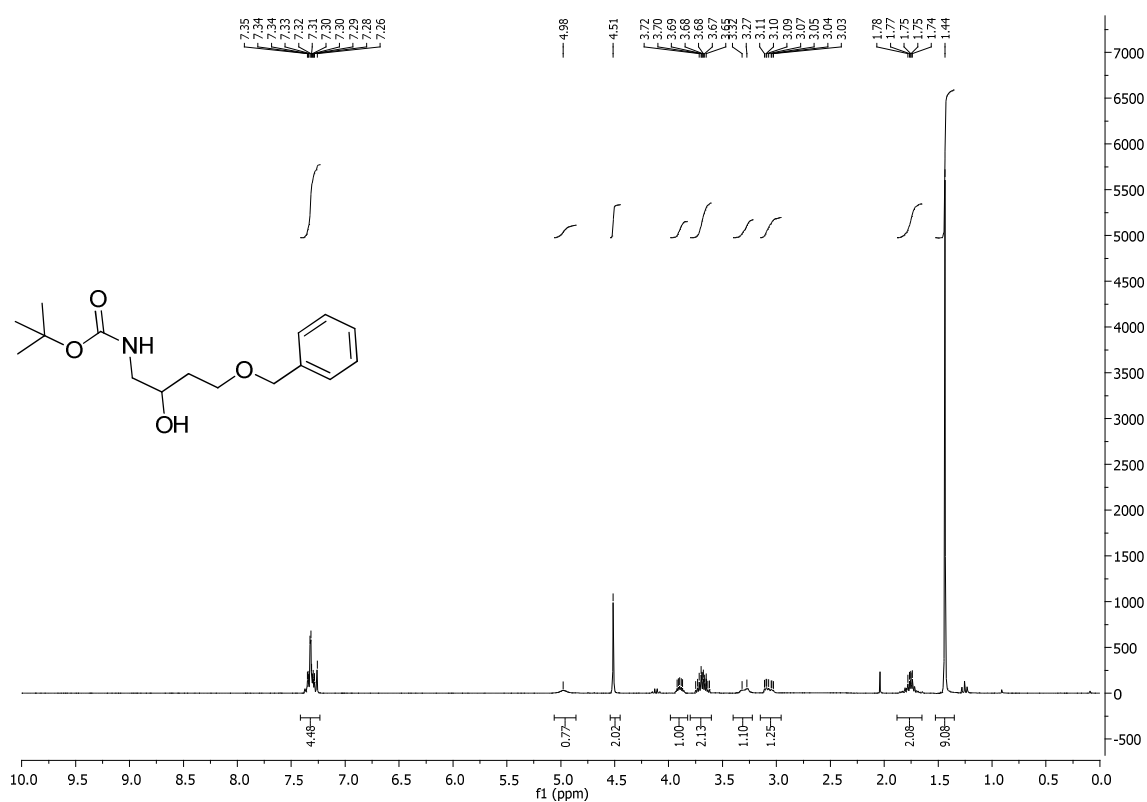
Abbildung 236: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Thioesters **79**.Abbildung 237: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Amins **160b**.

Abbildung 238: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Amins **160b**.Abbildung 239: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Amids **161a**.

Abbildung 240: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Amids **161a**.Abbildung 241: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Alkohols **161b**.

Abbildung 242: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Alkohols 161b.Abbildung 243: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des *cis*-Ethylesters 163a.

Abbildung 244: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des *cis*-Ethylesters 163a.Abbildung 245: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des *trans*-Ethylesters 163b.

Abbildung 246: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des *trans*-Ethylesters **163b**.Abbildung 247: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Alkohols **179d**.

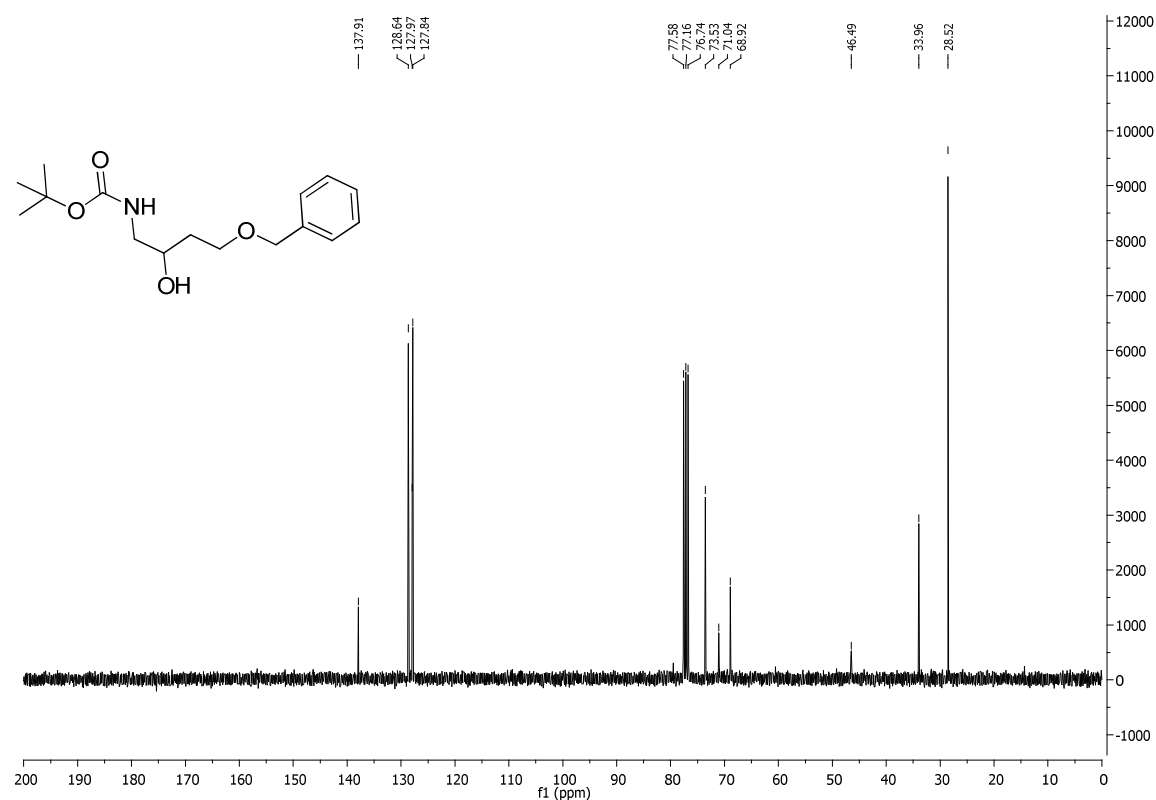


Abbildung 248: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Alkohols 179d.

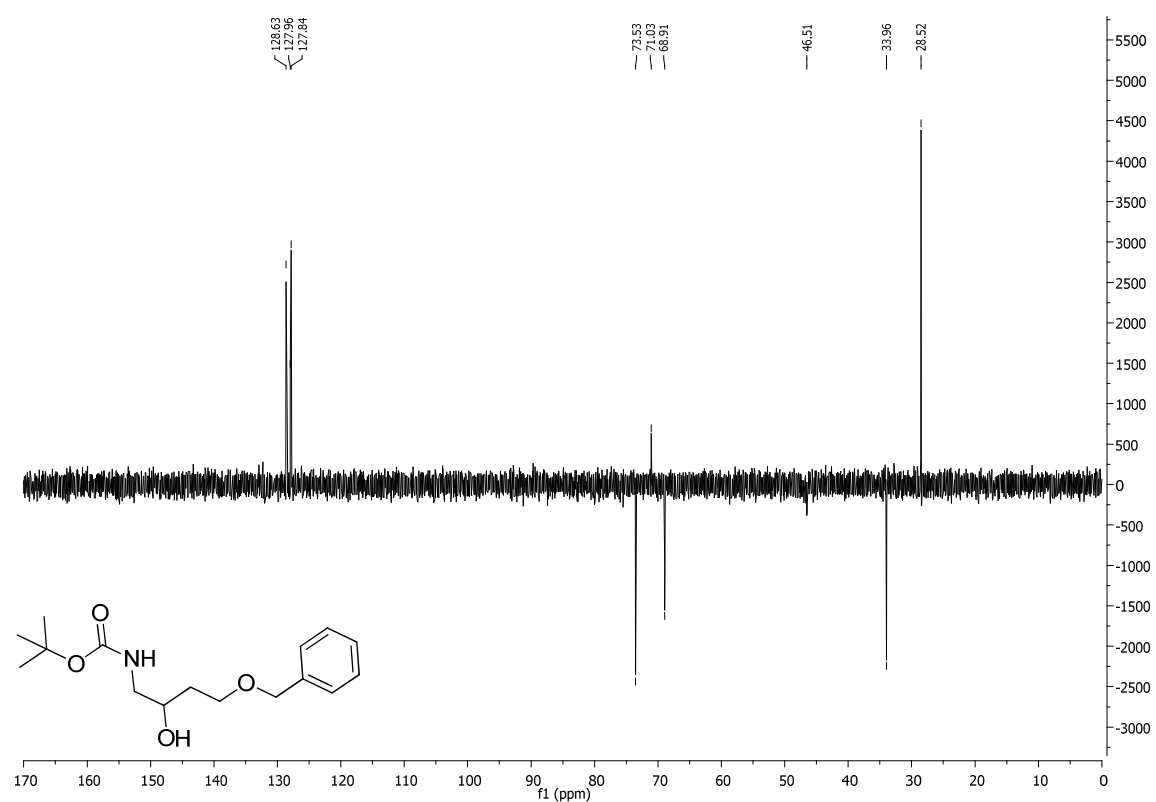
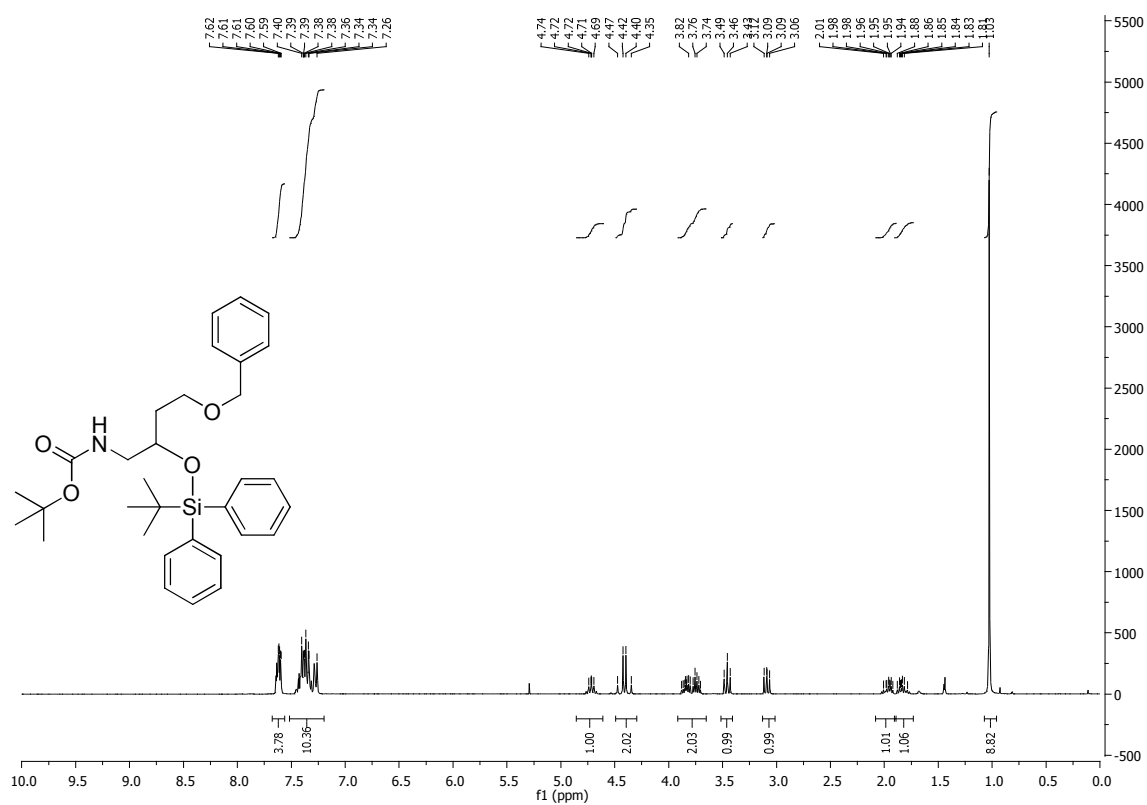
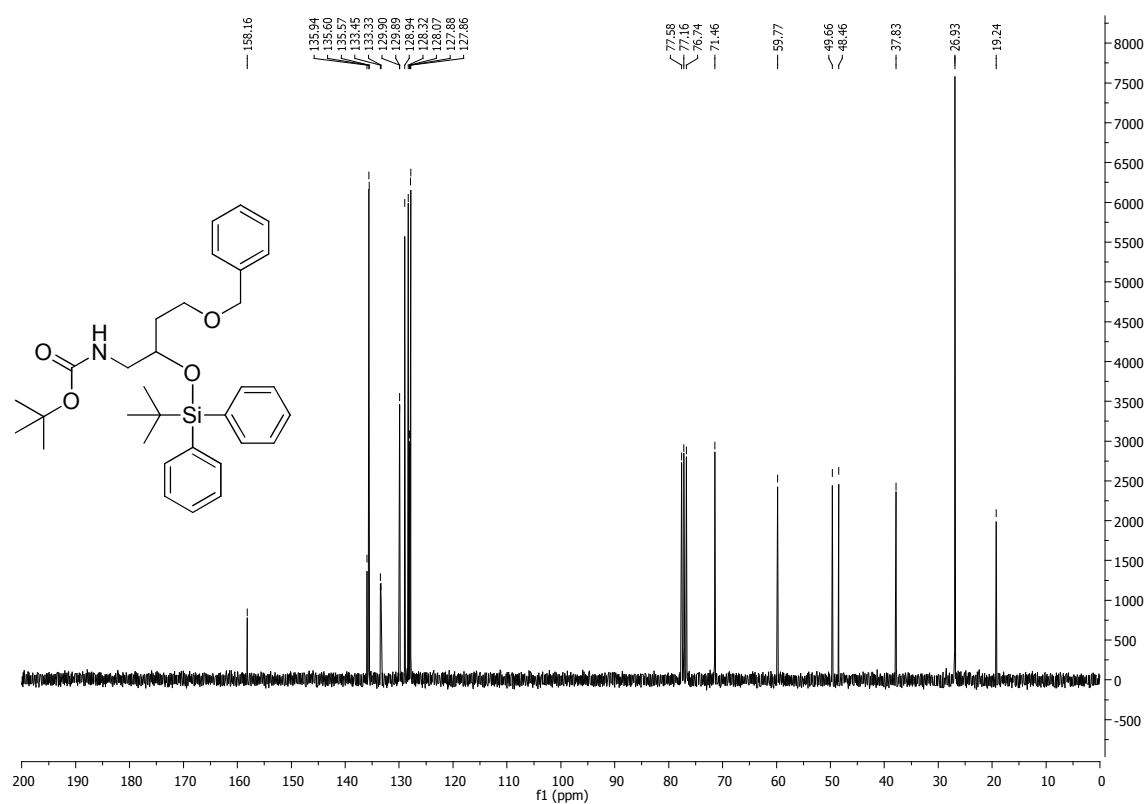
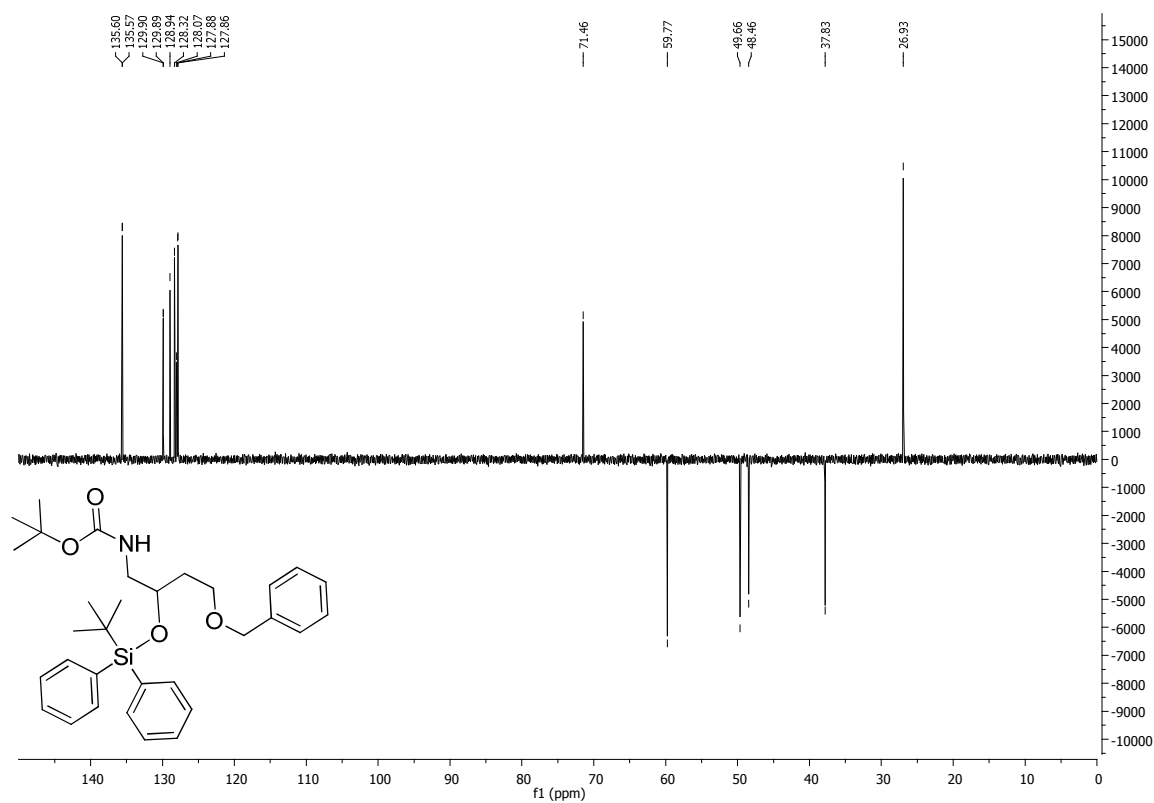
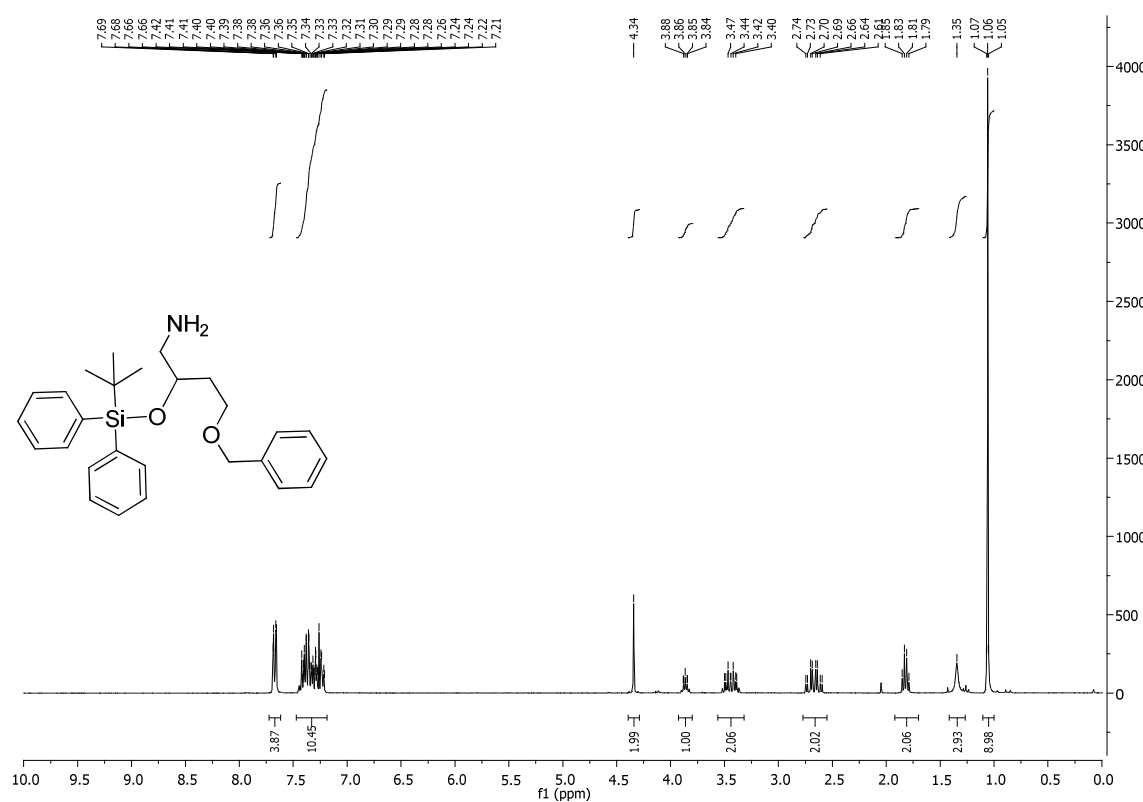


Abbildung 249: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Alkohols 179d.

Abbildung 250: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Benzylethers **179e**.Abbildung 251: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Benzylethers **179e**.

Abbildung 252: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Benzylethers **179e**.Abbildung 253: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Amins **179f**.

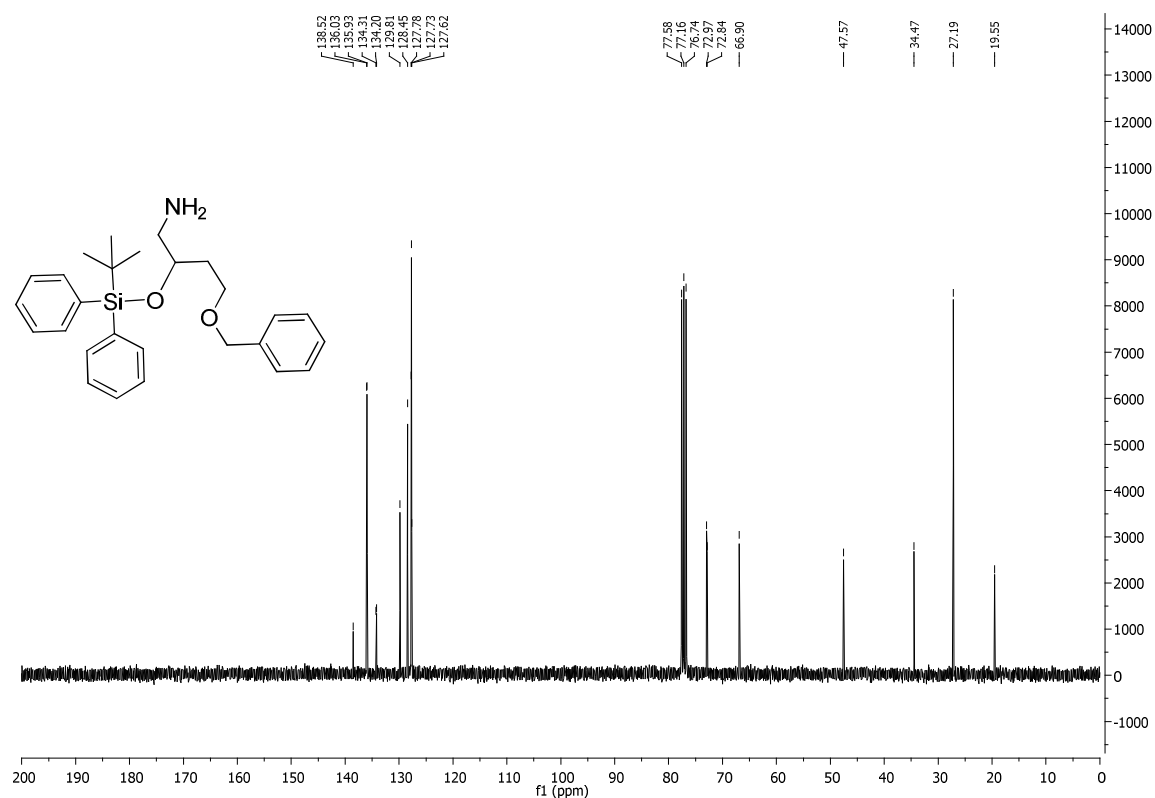


Abbildung 254: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Amins **179f**

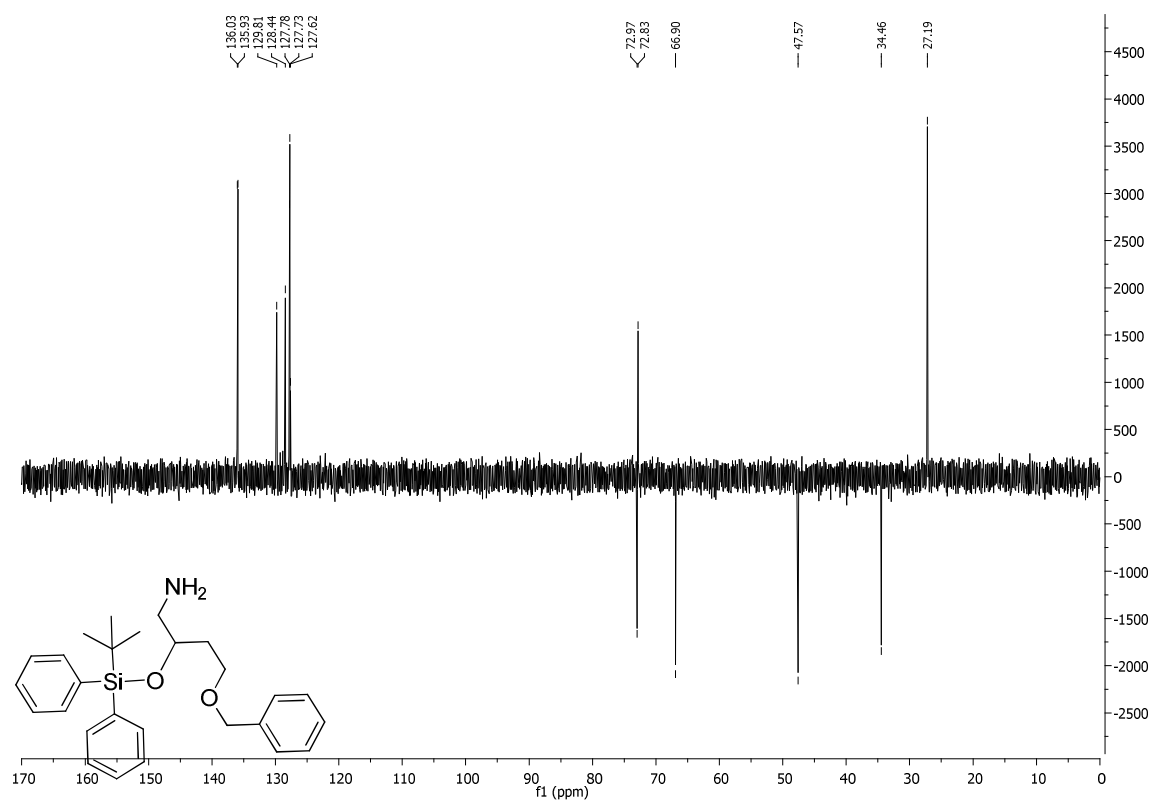
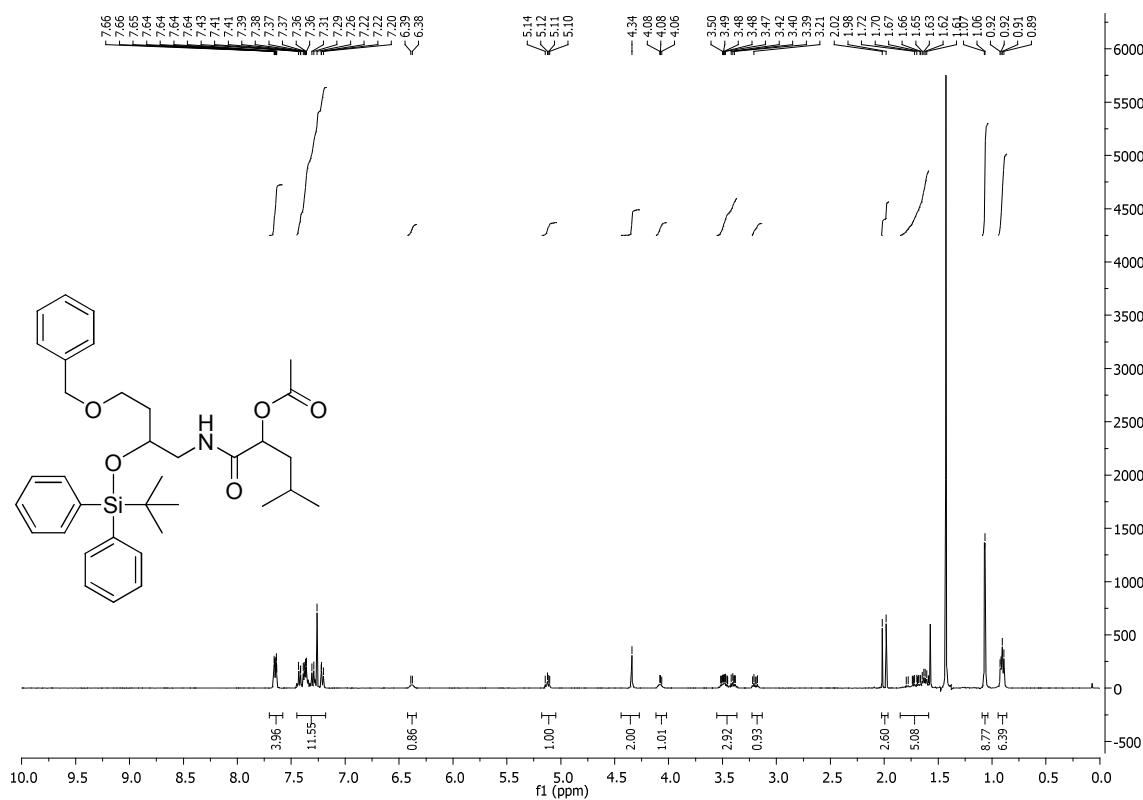
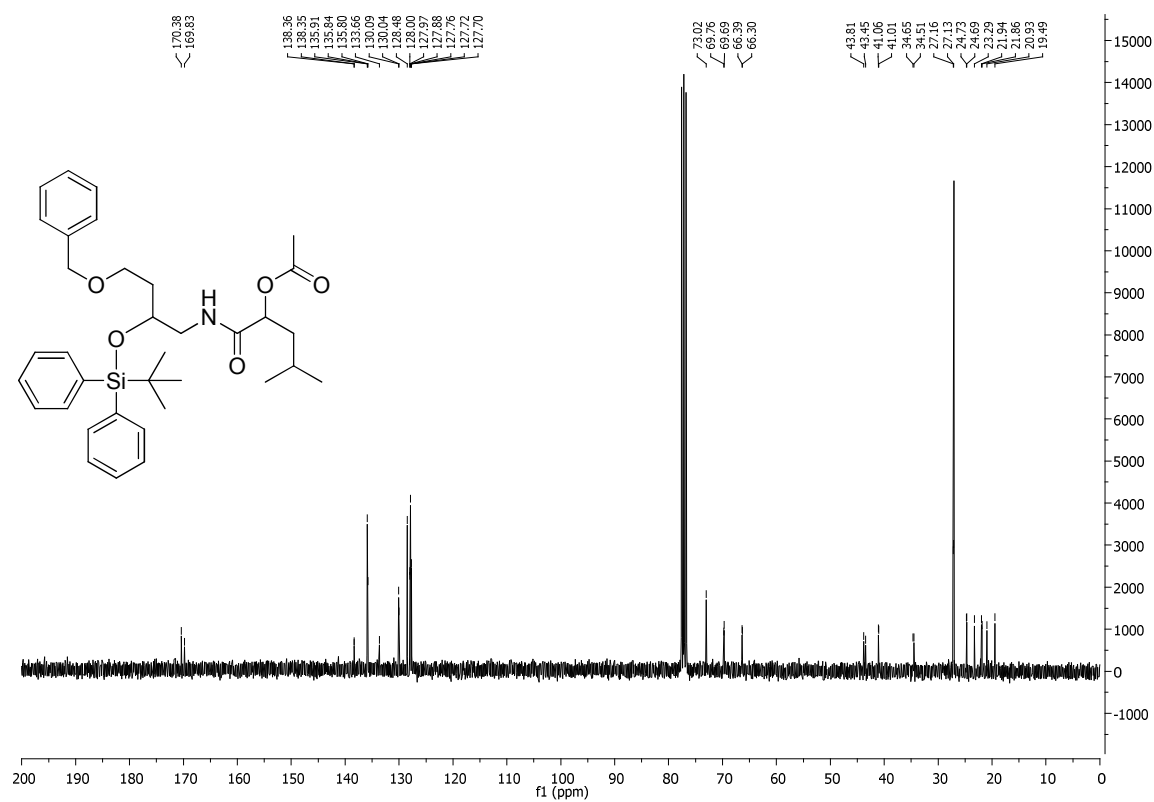
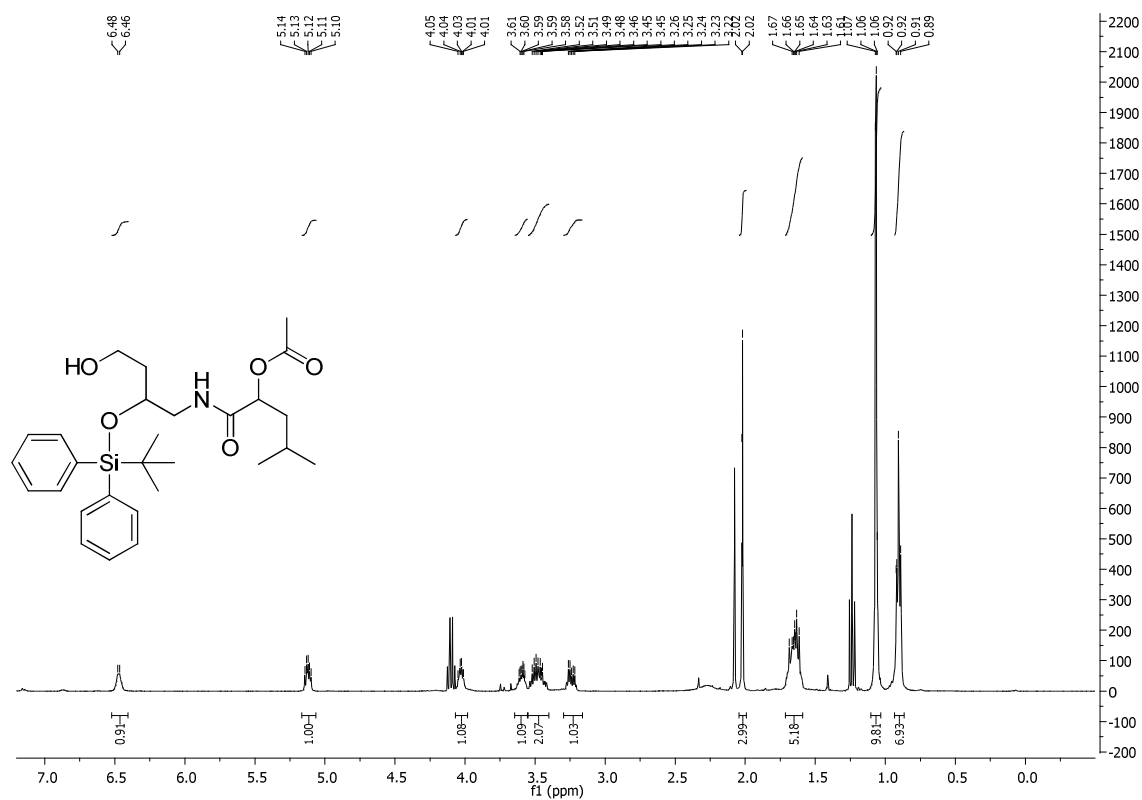
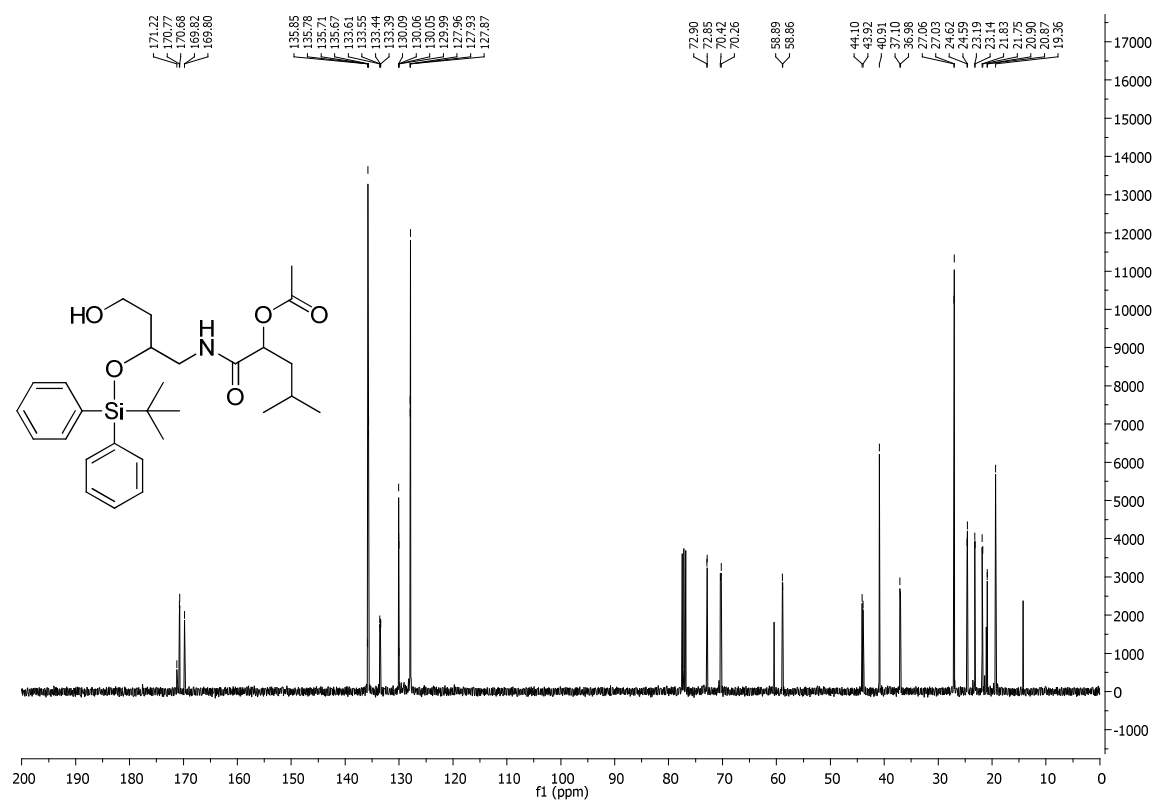
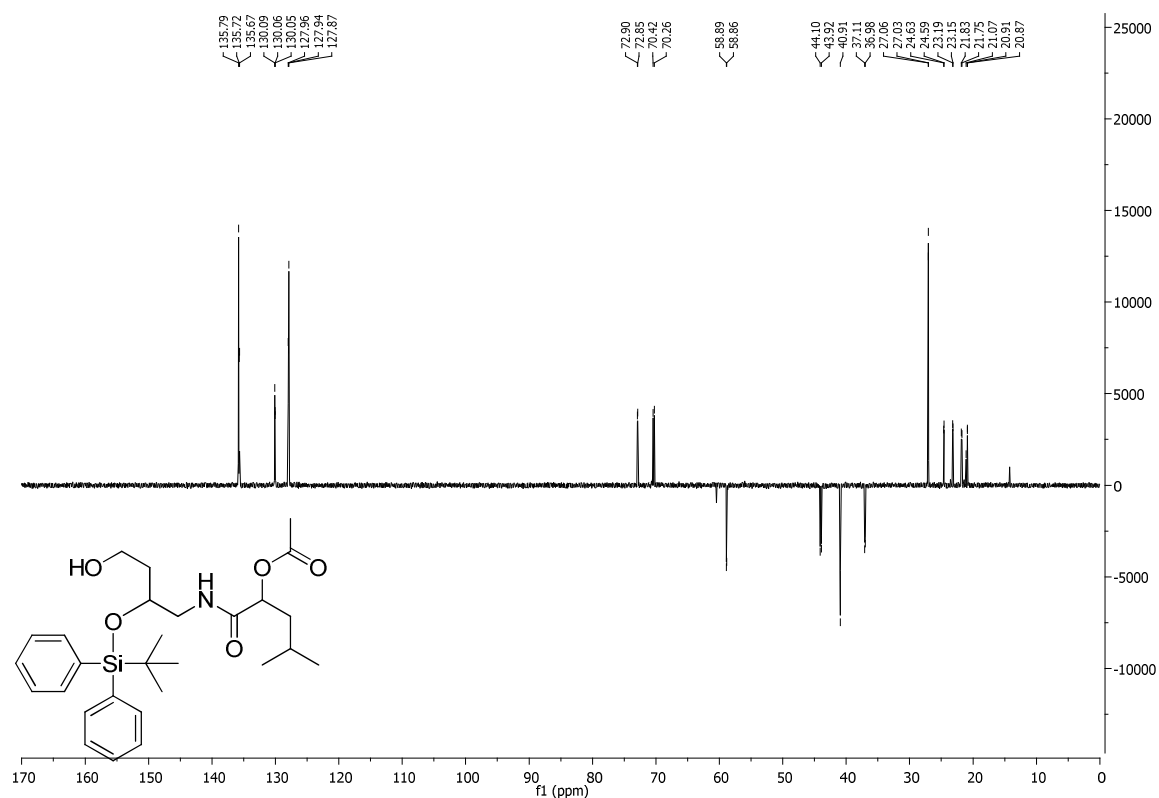
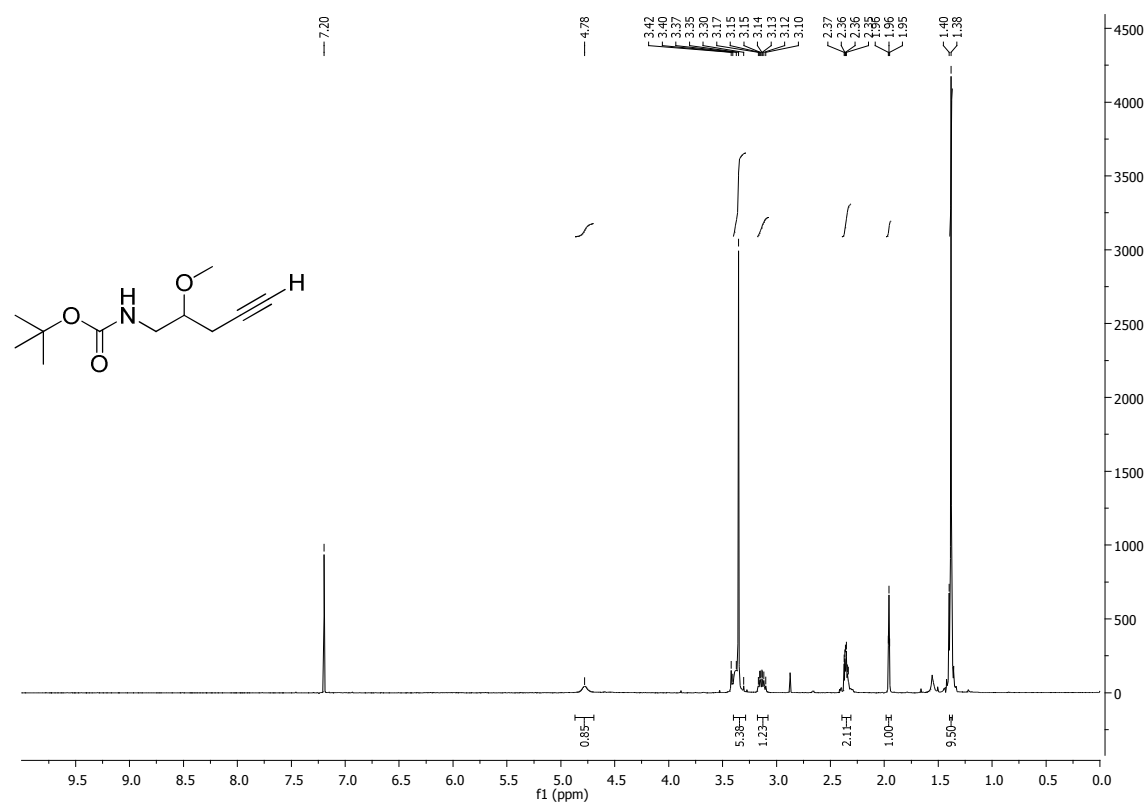
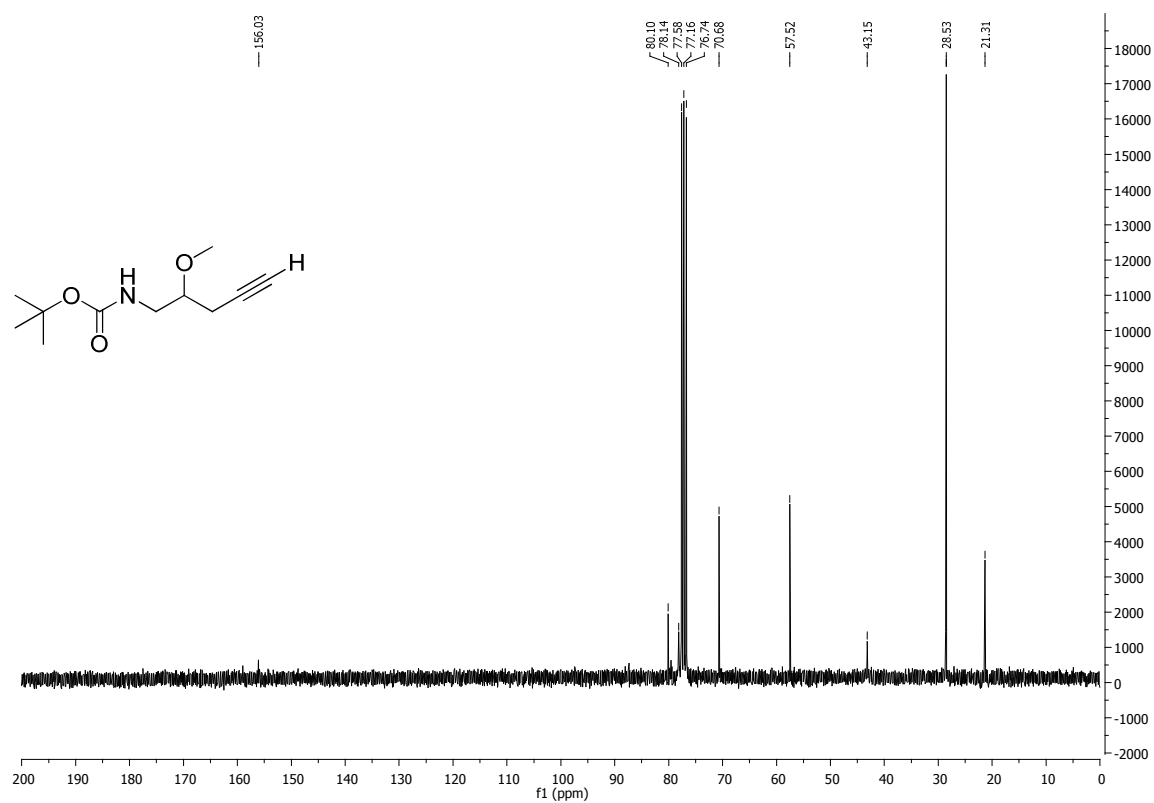
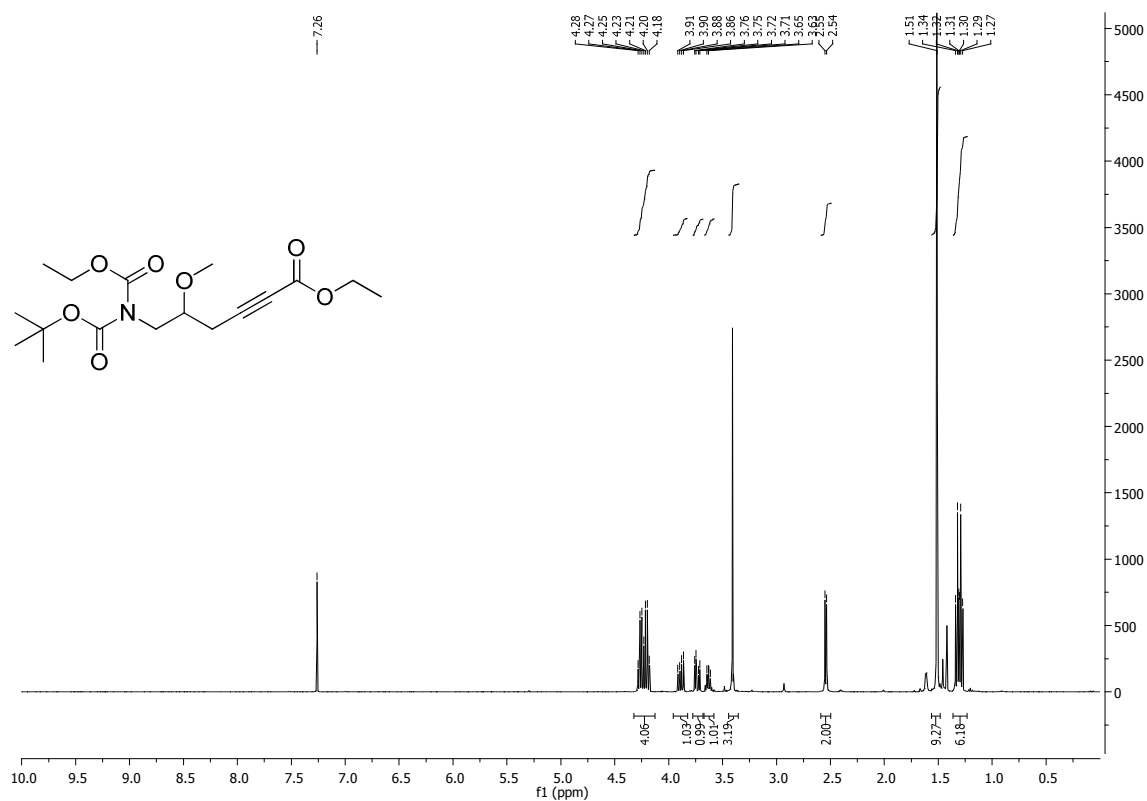


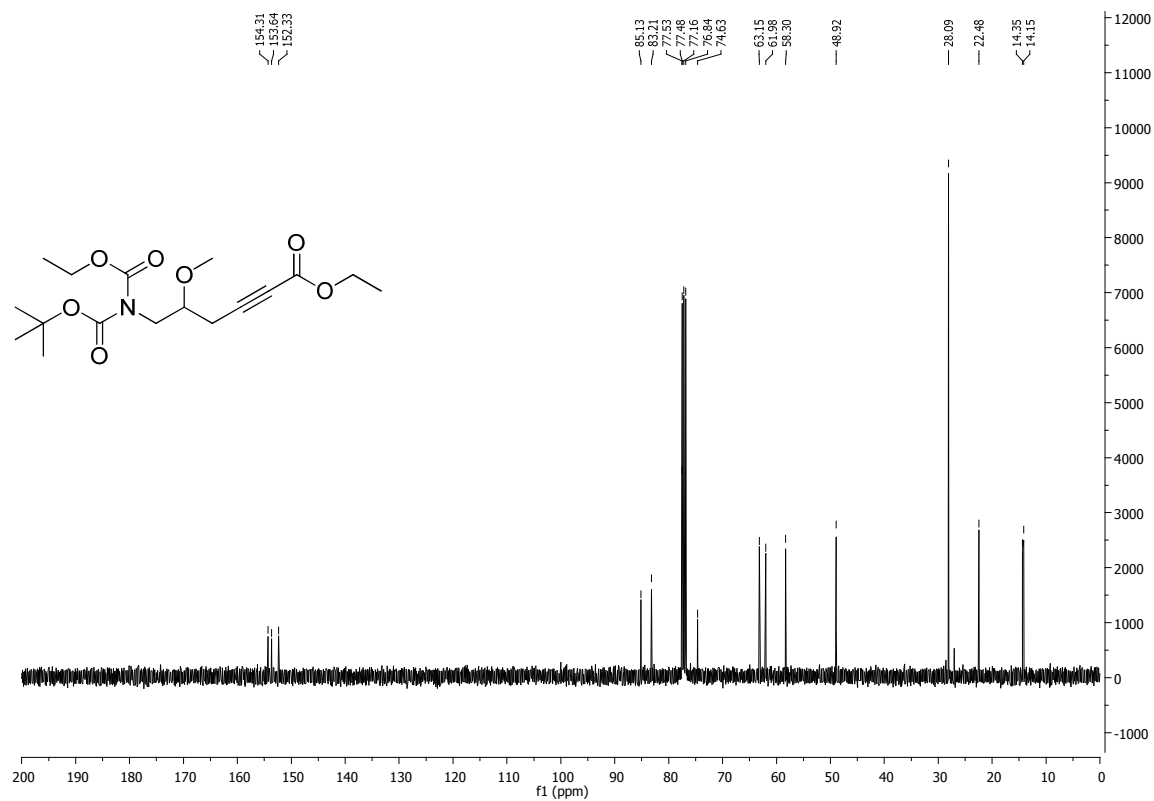
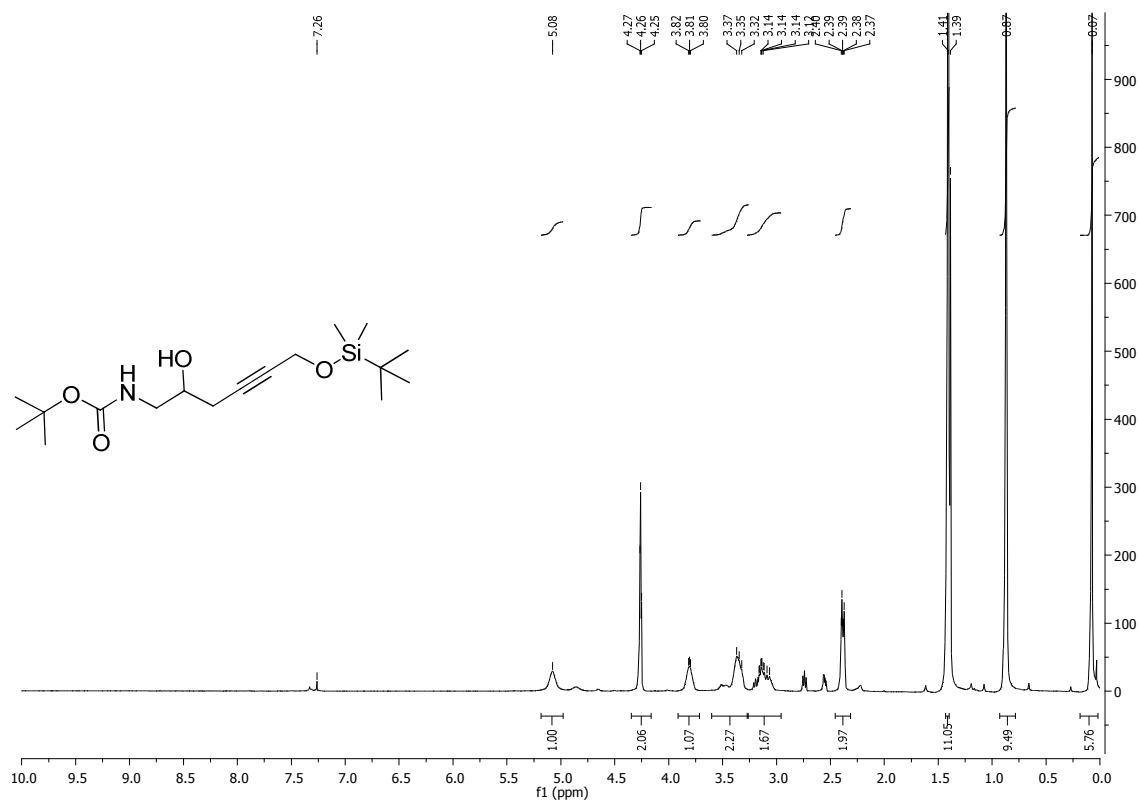
Abbildung 255: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Amins **179f**.

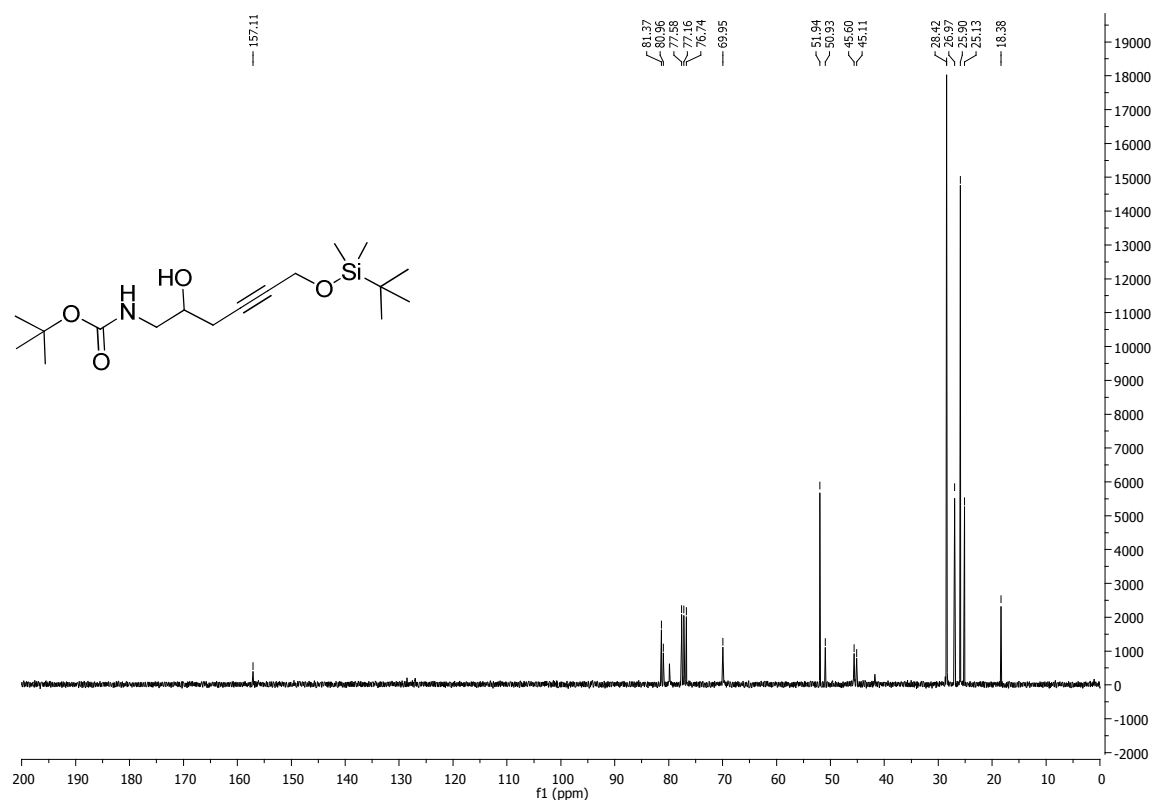
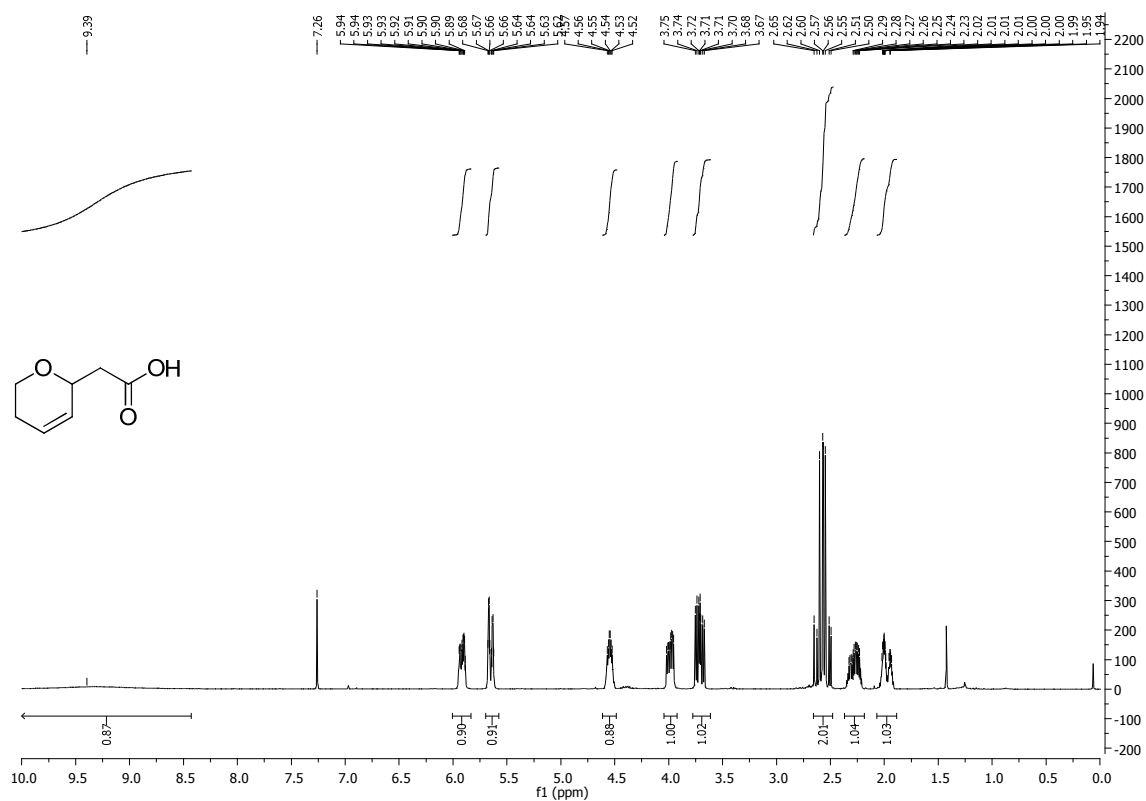
Abbildung 256: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Amids **180a**.Abbildung 257: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Amids **180a**.

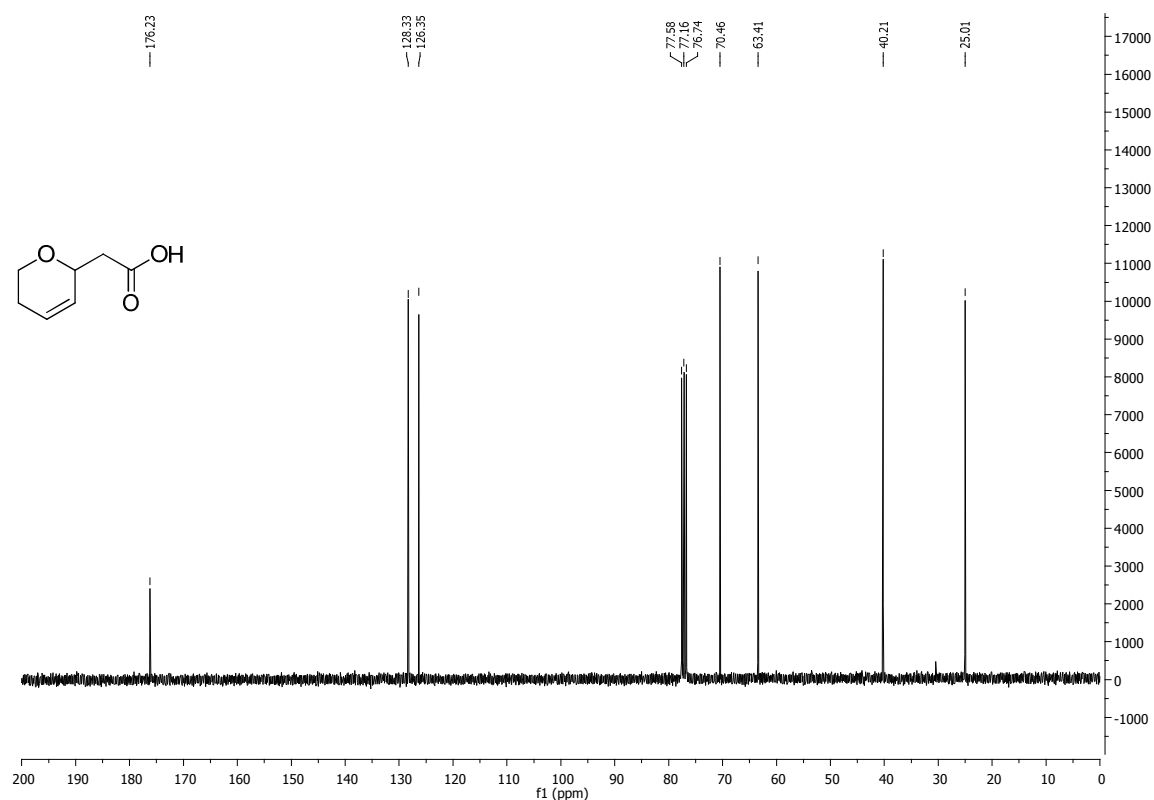
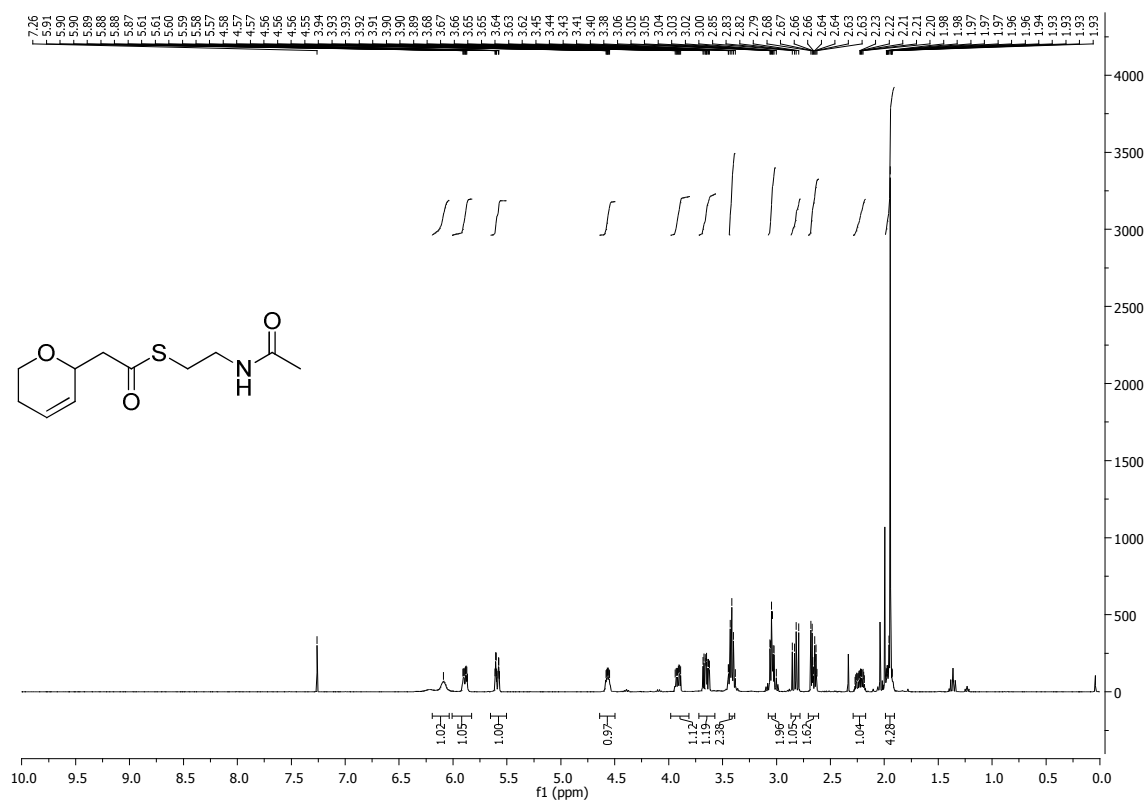
Abbildung 258: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Amids **180b**.Abbildung 259: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Amids **180b**.

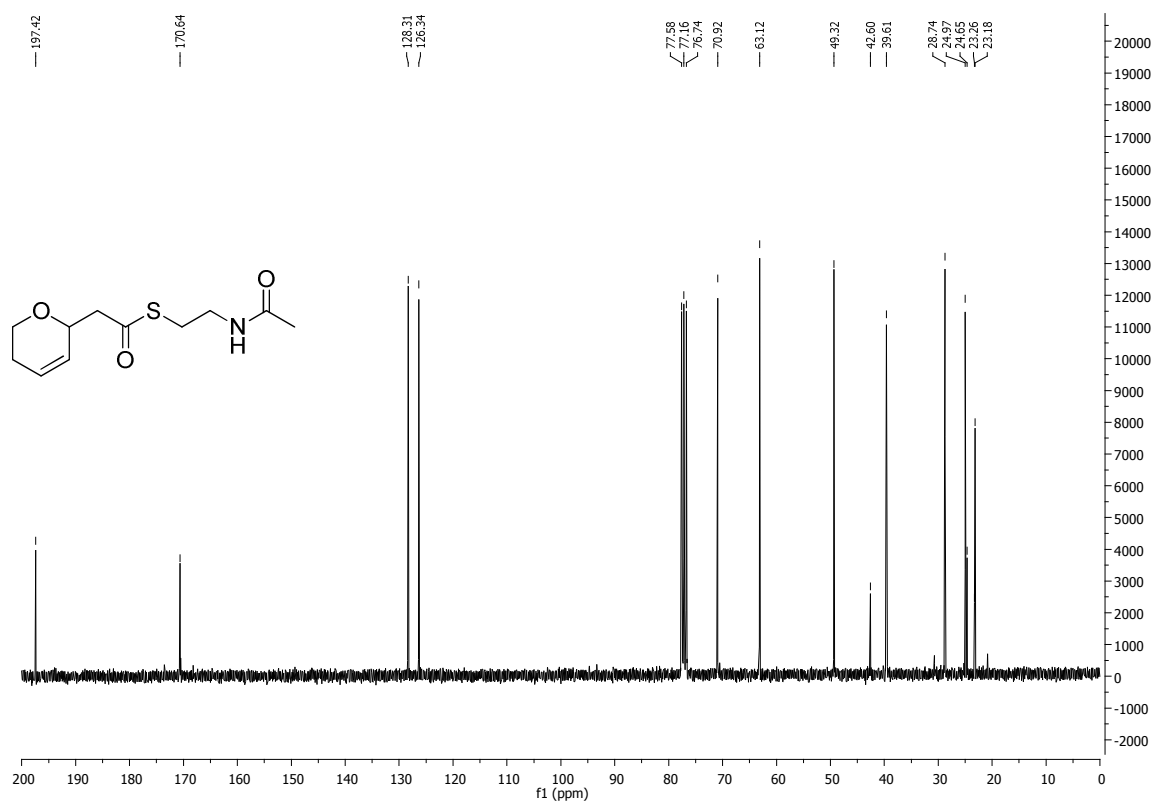
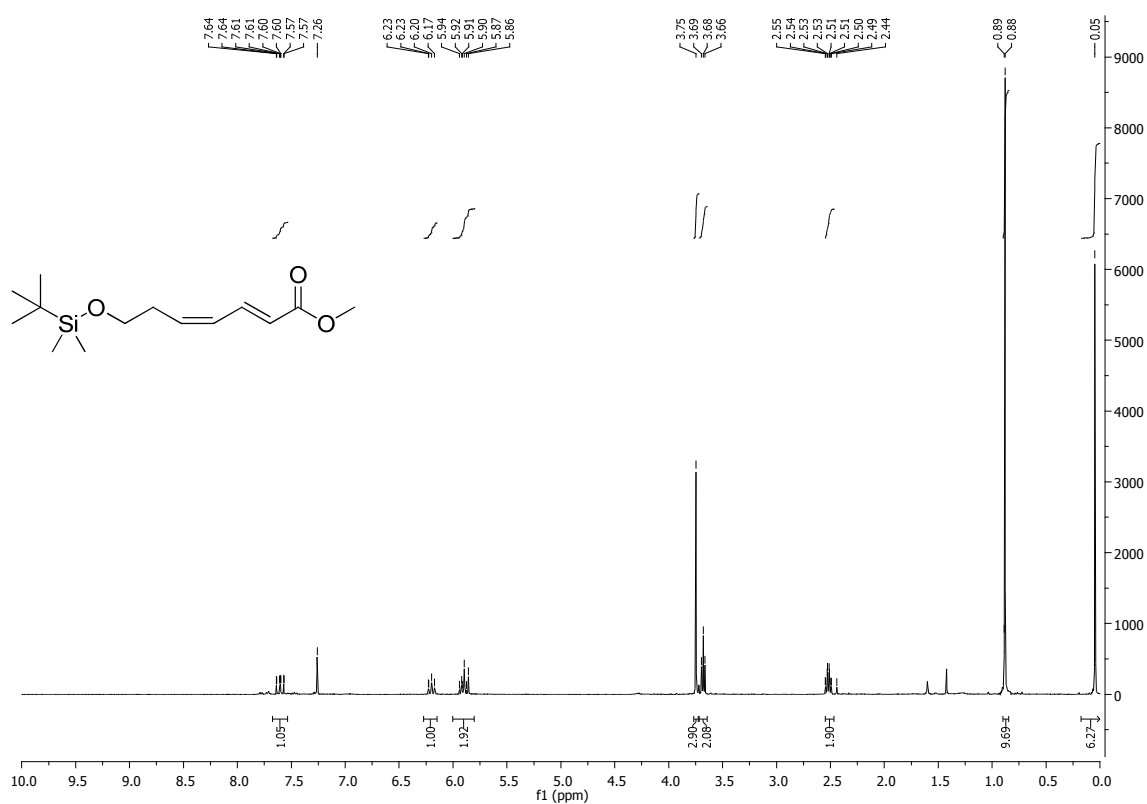
Abbildung 260: DEPT-135-Spektrum (75 MHz) des Amids **180b**.Abbildung 261: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Alkins **87b**.

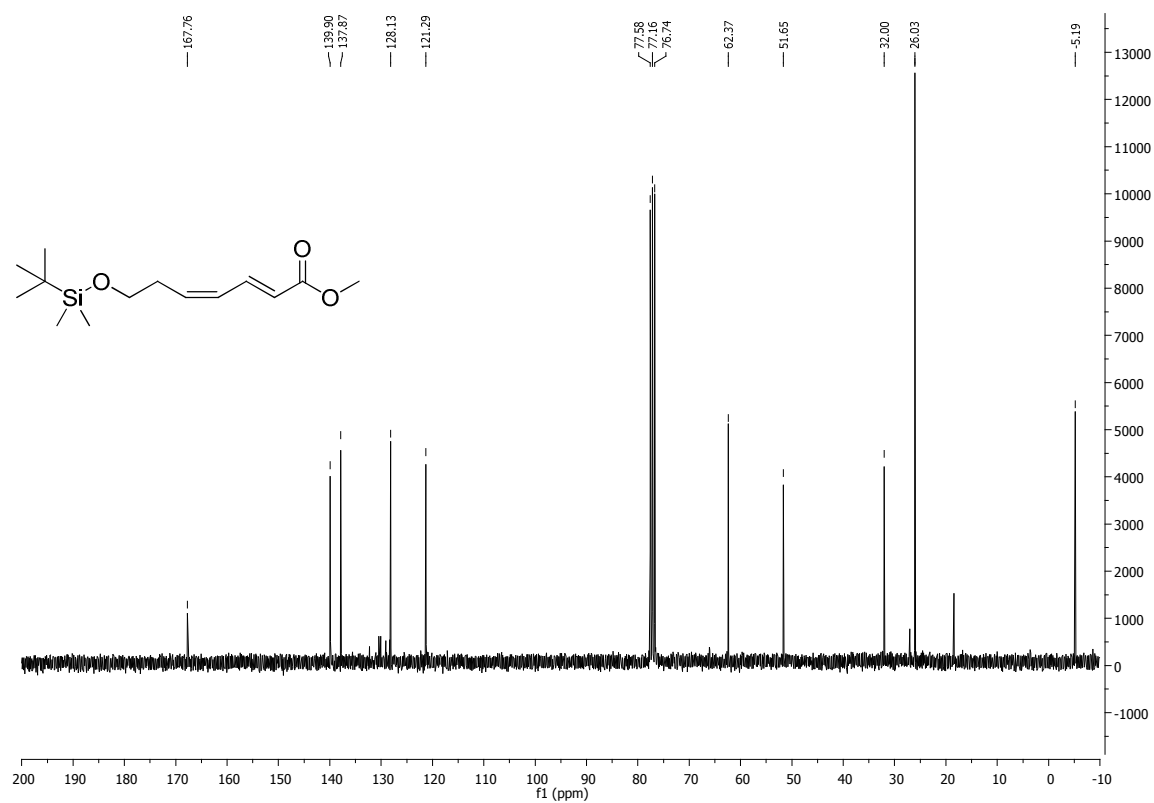
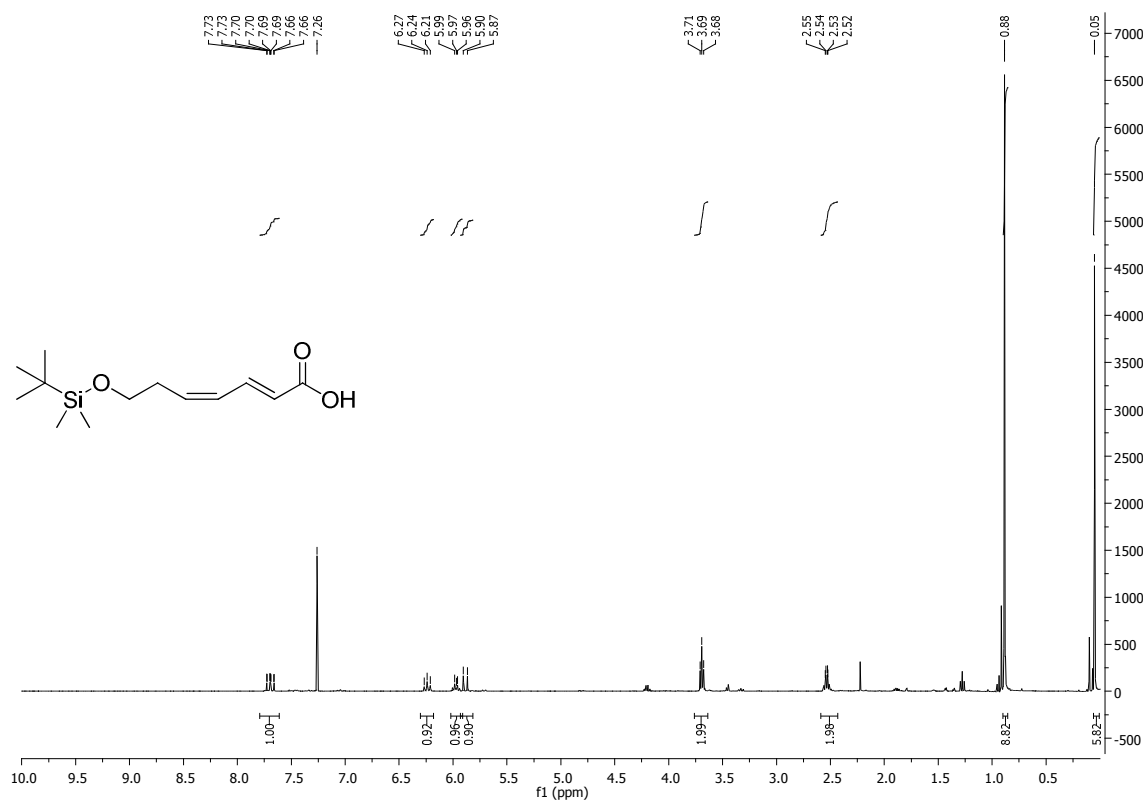
Abbildung 262: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Alkyls **87b**.Abbildung 263: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Alkinesters **170a**.

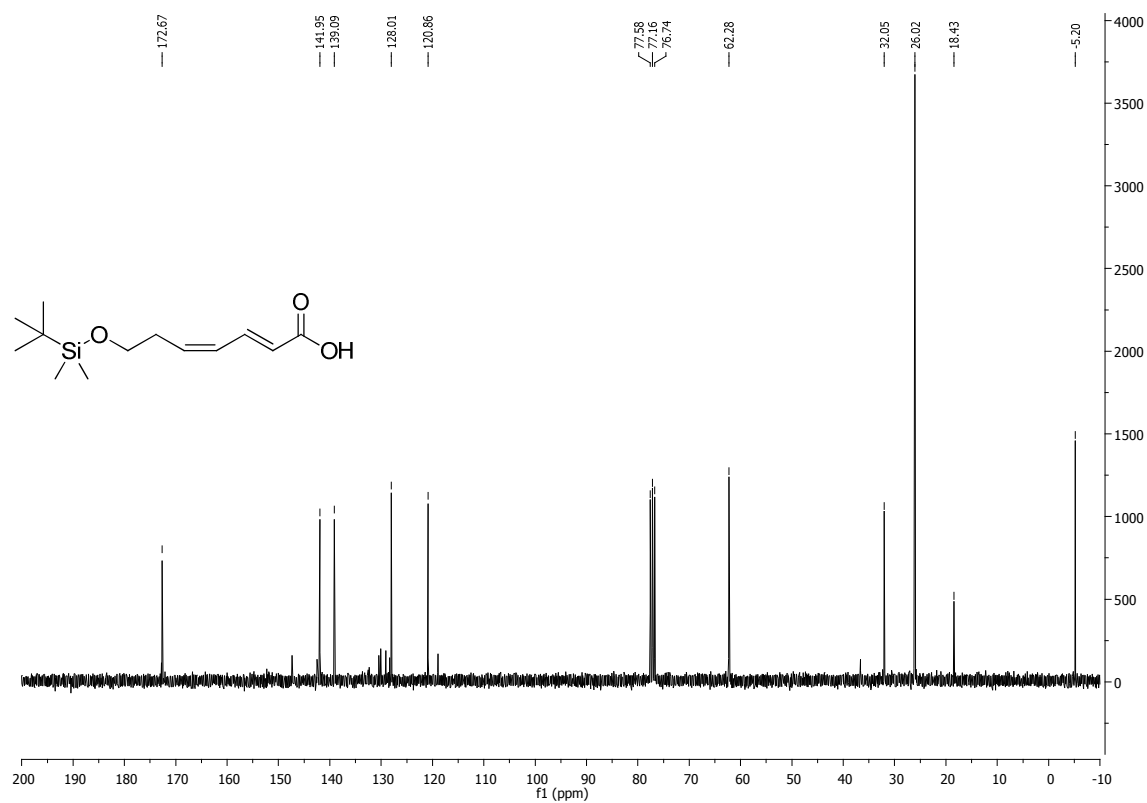
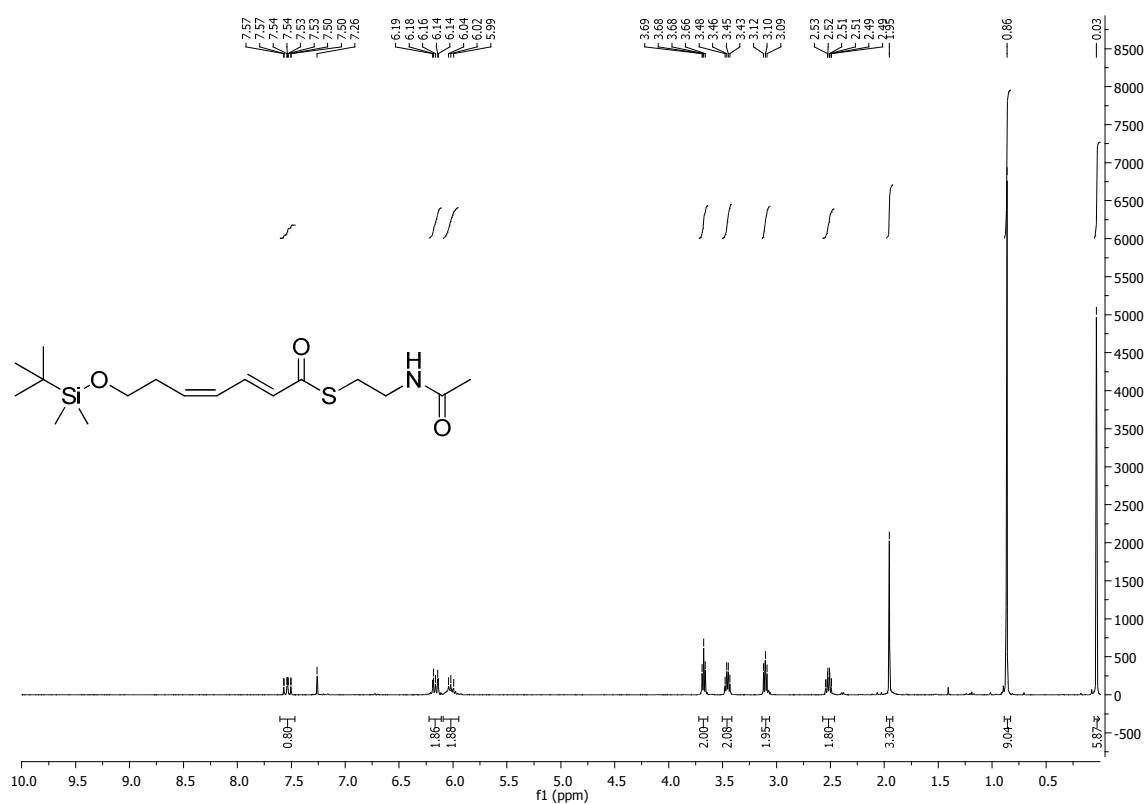
Abbildung 264: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Alkinesters 170a.Abbildung 265: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Alkins 177.

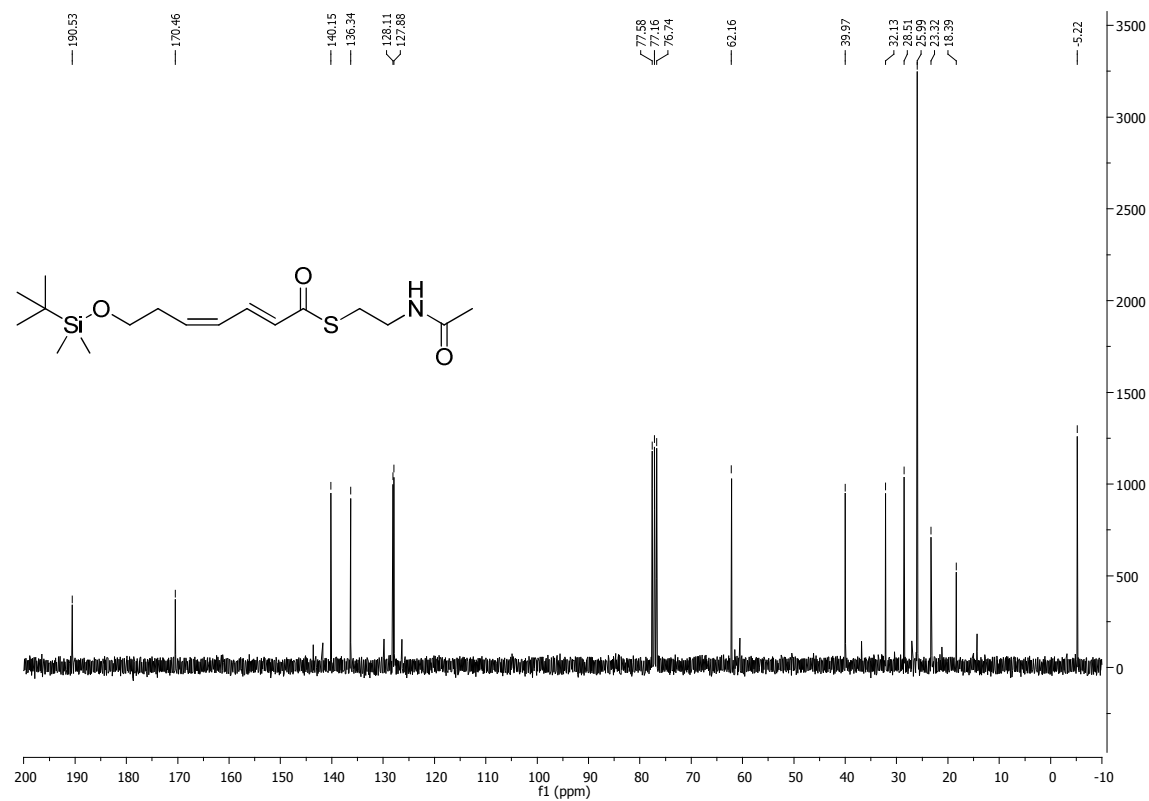
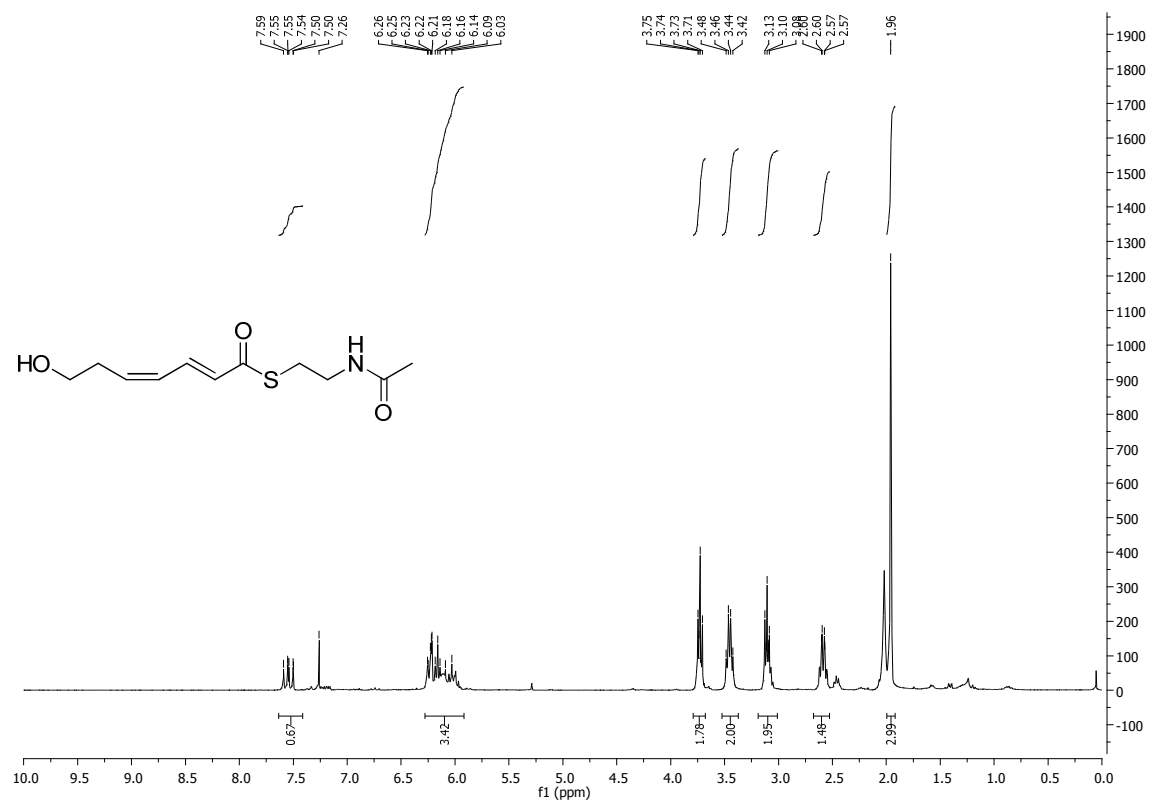
Abbildung 266: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Alkyls 177.Abbildung 267: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure 98.

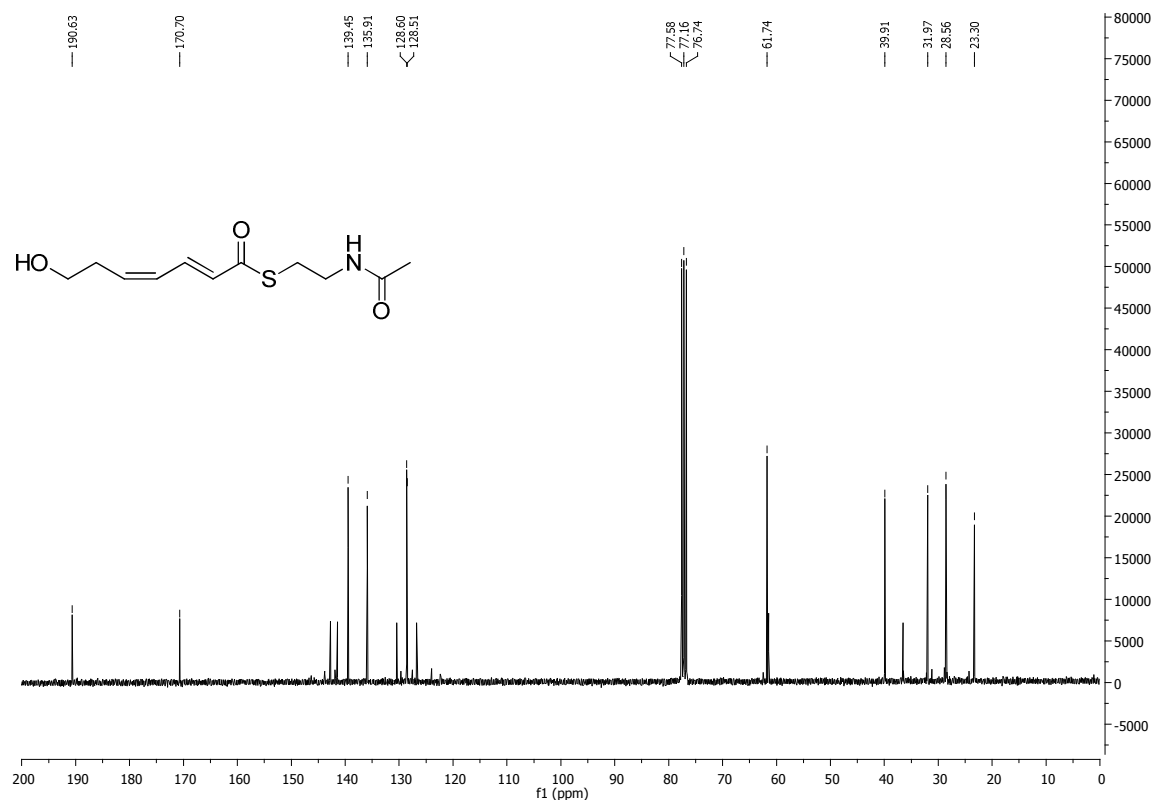
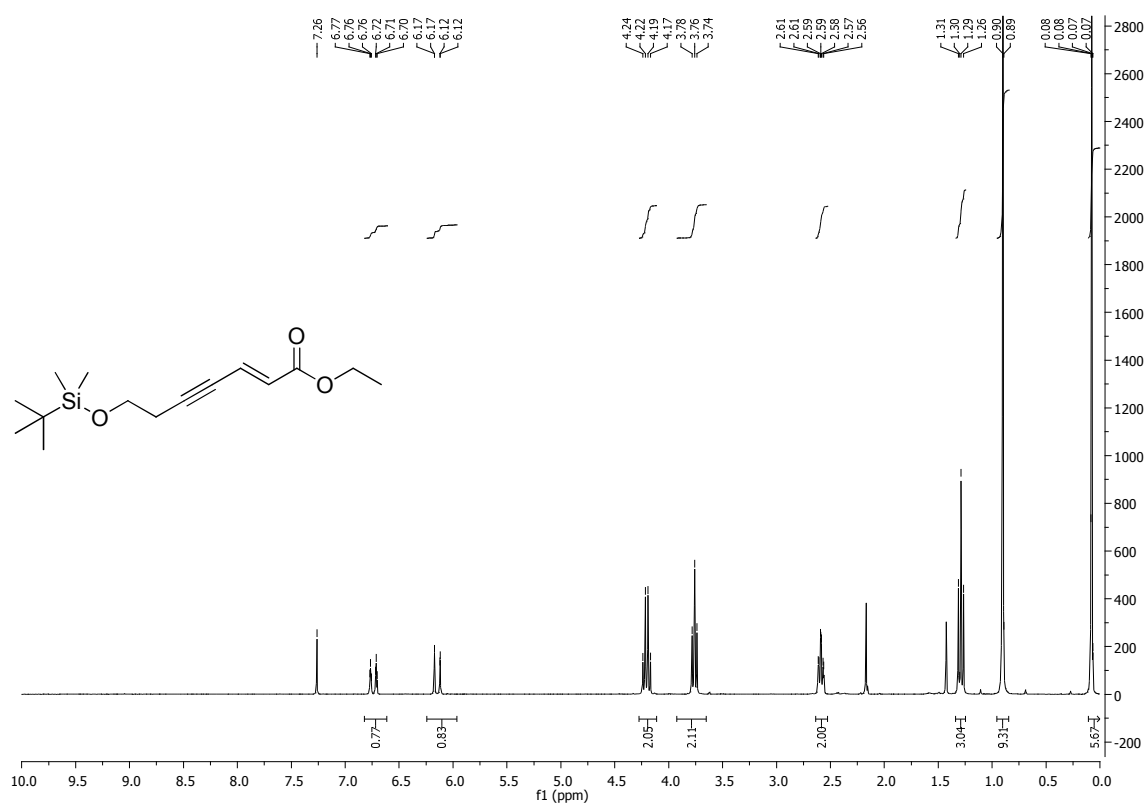
Abbildung 268: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) der Säure 98.Abbildung 269: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 90.

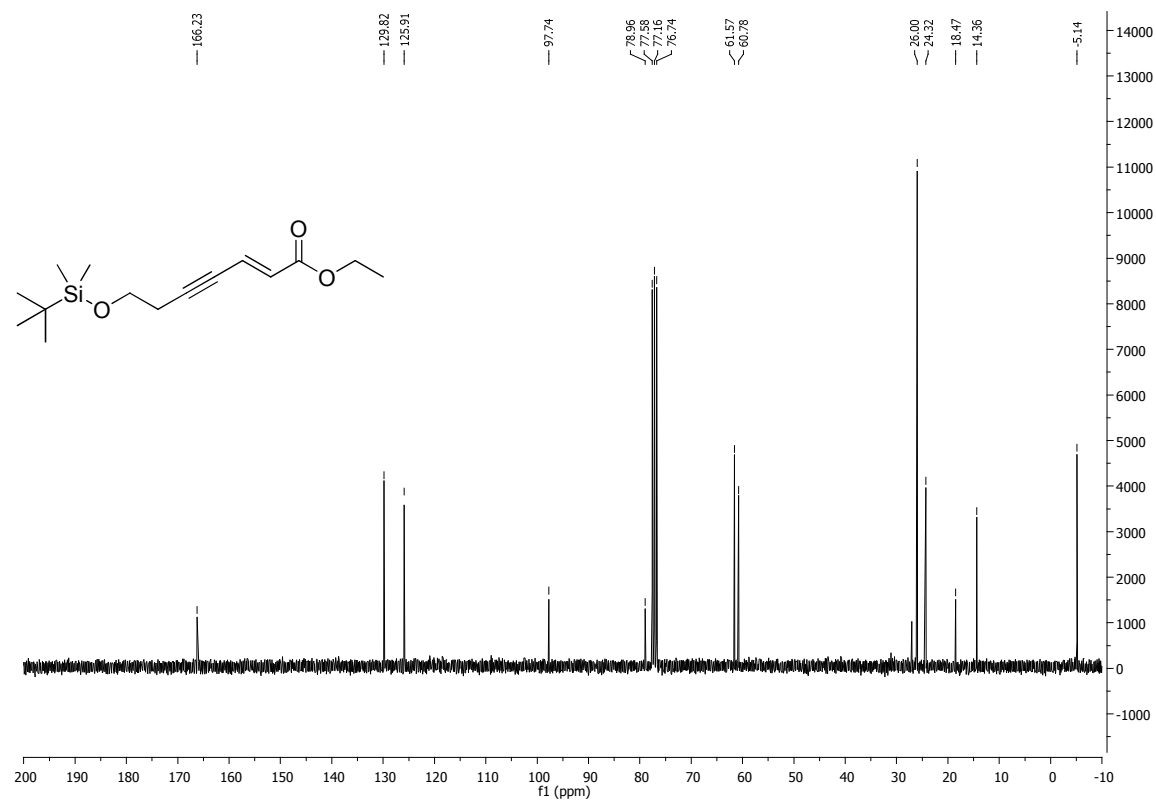
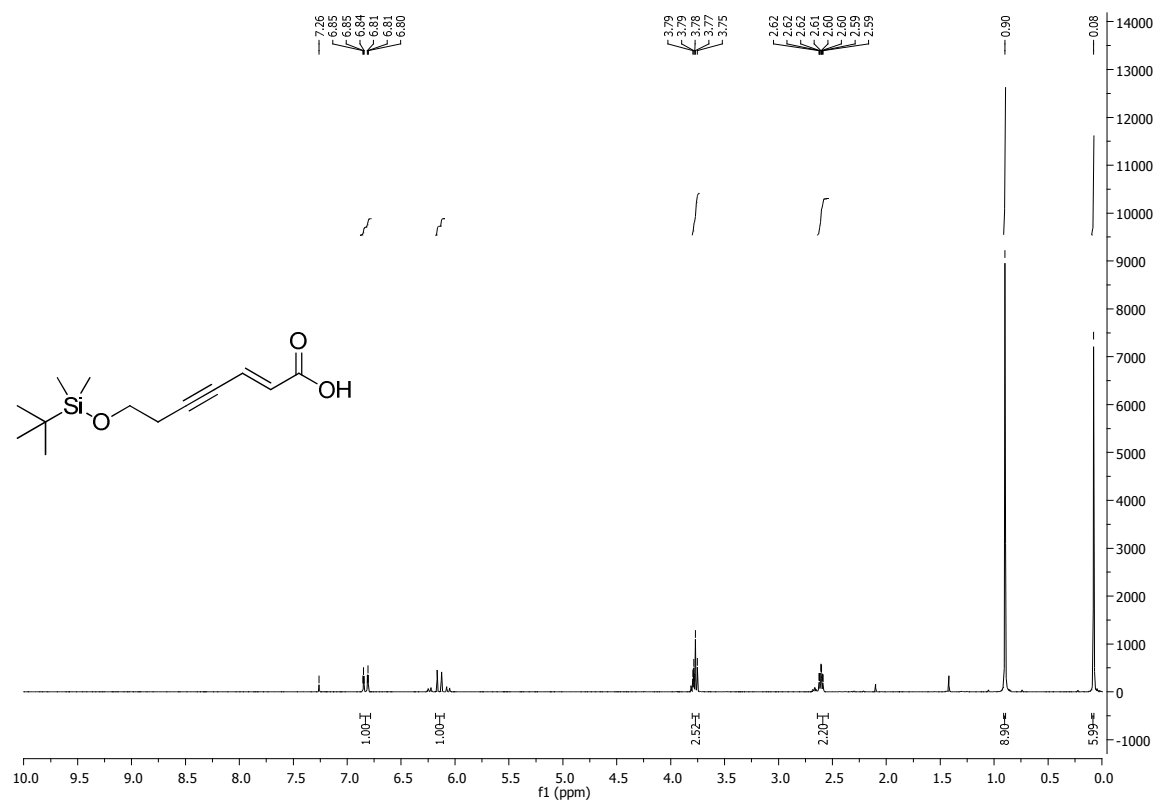
Abbildung 270: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters **90**.Abbildung 271: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Methylesters **185a**.

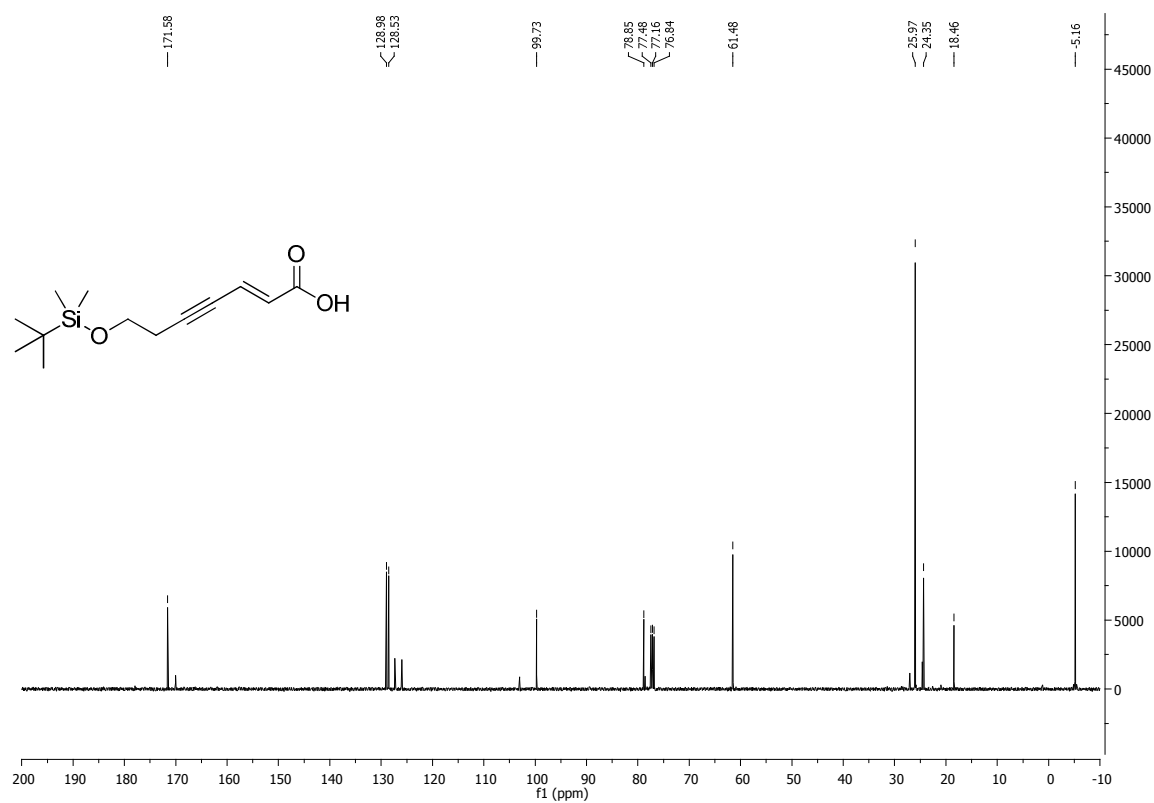
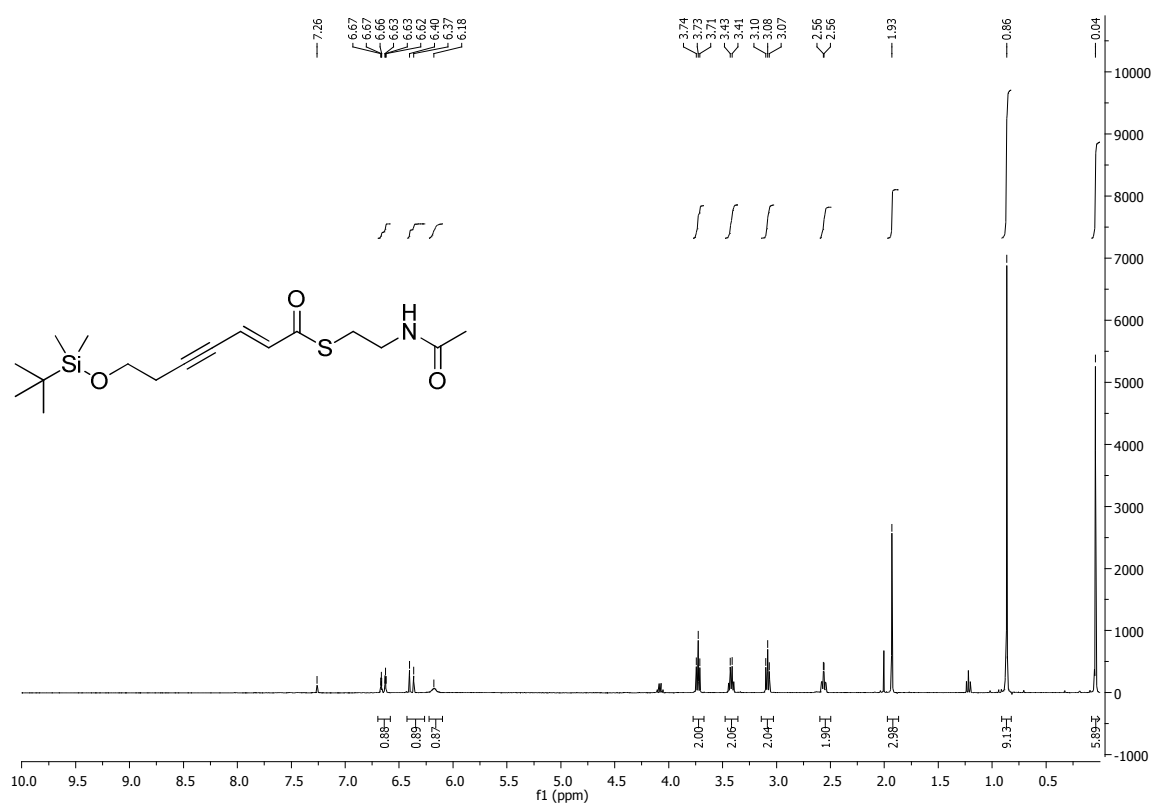
Abbildung 272: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Methylesters 185a.Abbildung 273: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure 185b.

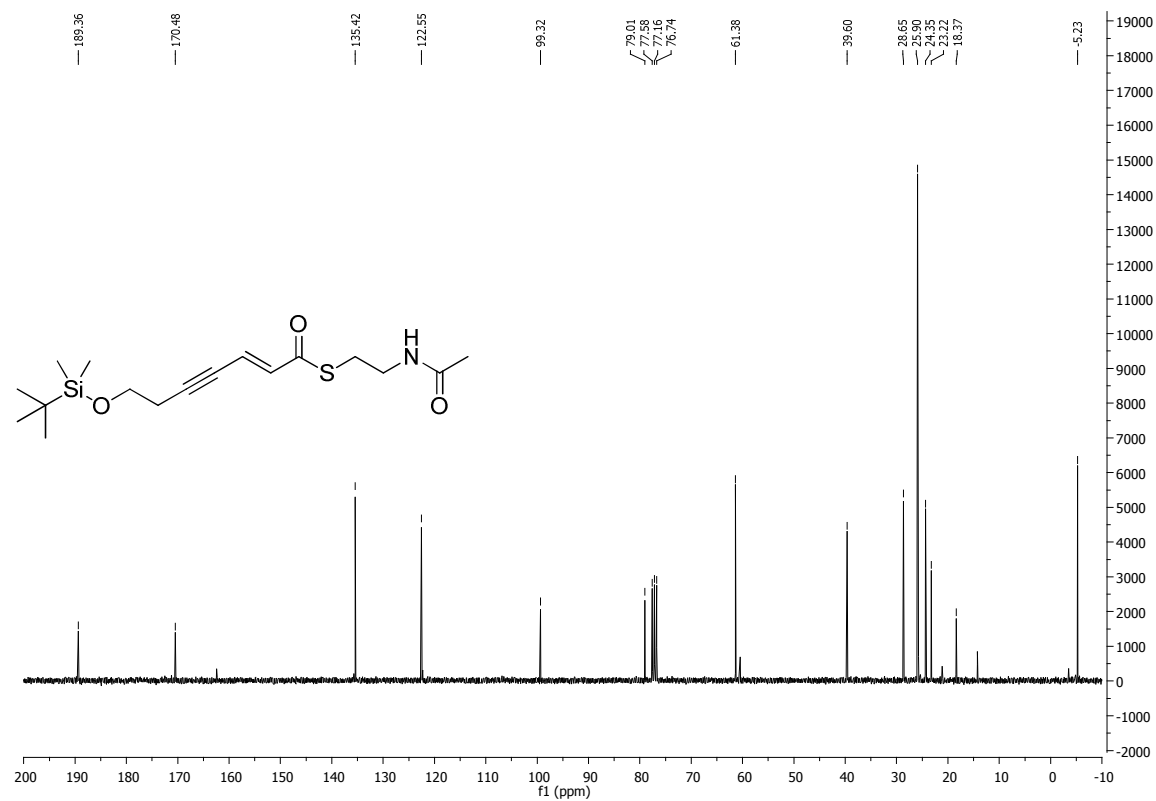
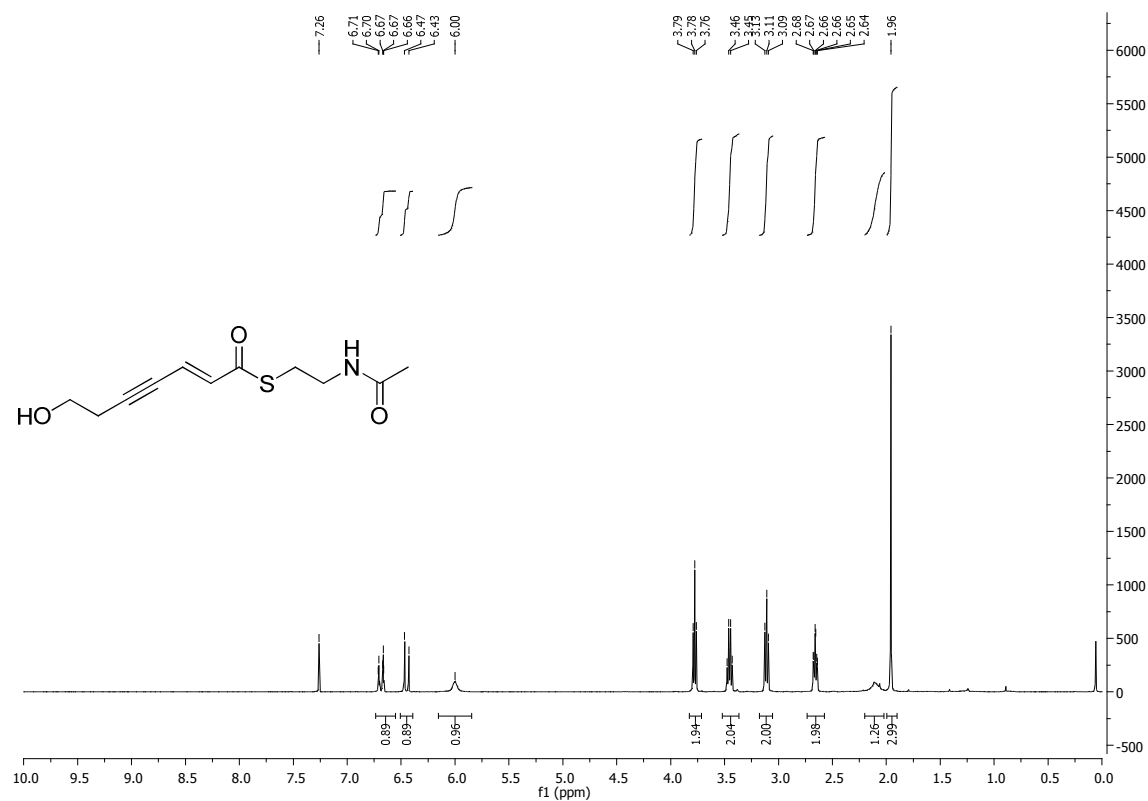
Abbildung 274: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) der Säure **185b**.Abbildung 275: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters **186**.

Abbildung 276: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters **186**.Abbildung 277: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters **91**.

Abbildung 278: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters **91**.Abbildung 279: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Ethylesters **101a**.

Abbildung 280: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Ethylesters **101a**.Abbildung 281: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure **101b**.

Abbildung 282: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) der Säure **101b**.Abbildung 283: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters **102a**.

Abbildung 284: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters **102a**.Abbildung 285: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters **102b**.

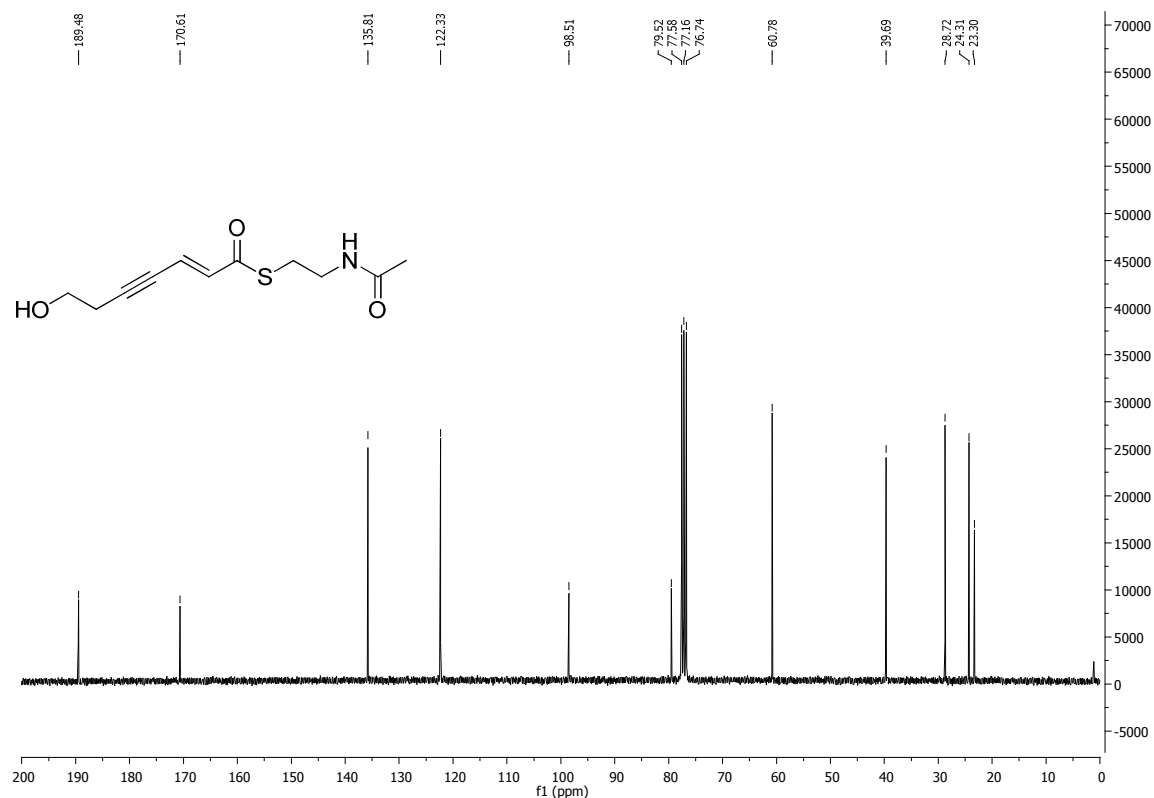


Abbildung 286: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters **102b**.

6.2 LC-HRMS-Daten

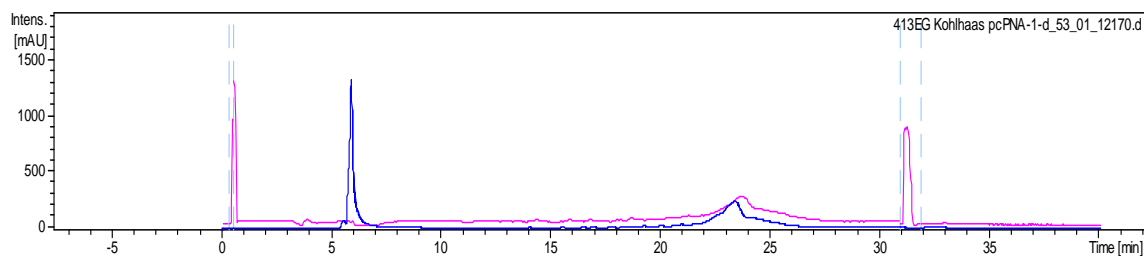


Abbildung 287: LC-HRMS-Lauf des pcPNA₁-Strangs **193**; violett: Massenspur, blau: UV-Chromatogramm (260 nm).

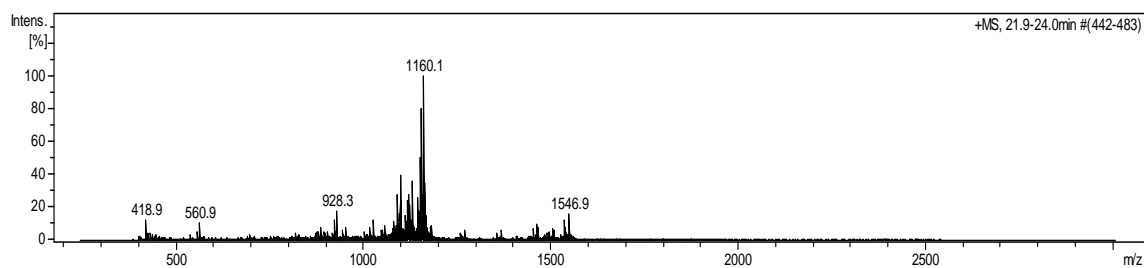


Abbildung 288: Massenverteilung im Bereich von 21.9 min bis 24.0 min des LC-HRMS-Lauf des pcPNA₁-Strangs **193**.

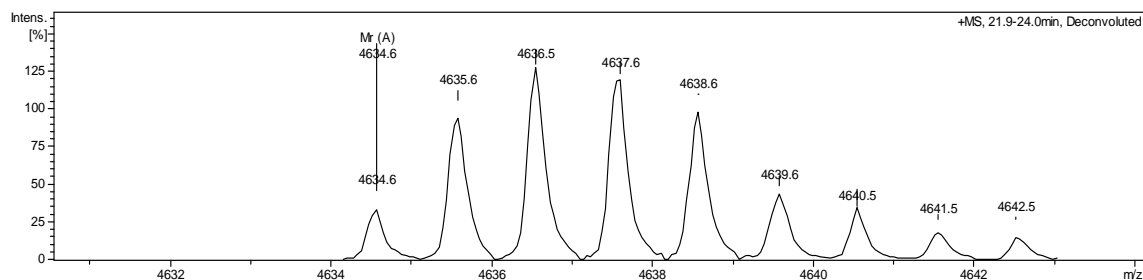


Abbildung 289: Vergrößerte Darstellung des neutralen Spektrums des LC-HRMS-Laufs des pcPNA₁-Strangs 193 im Bereich von 21.9 min bis 24.0 min.

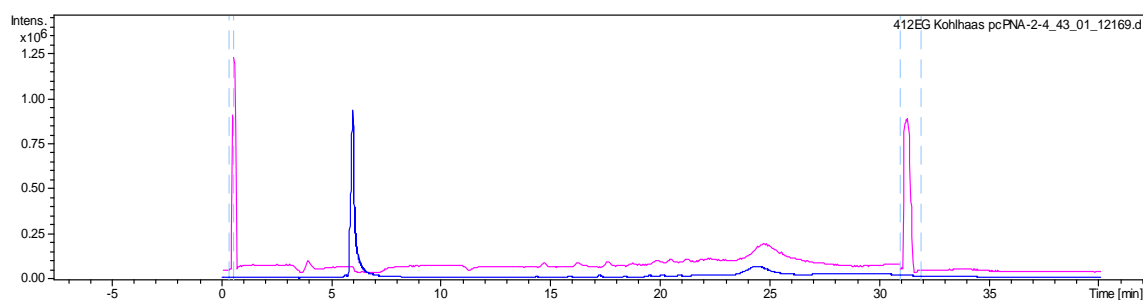


Abbildung 290: LC-HRMS-Lauf des pcPNA₂-Strangs 194; violett: Massenspur, blau: UV-Chromatogramm (260 nm).

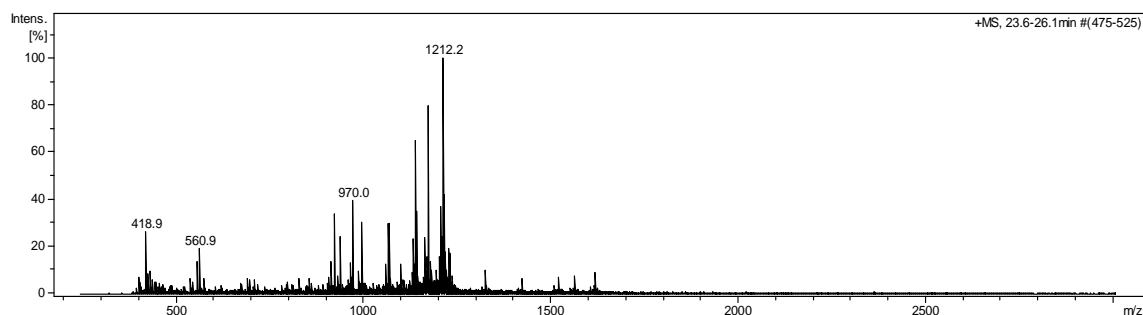


Abbildung 291: Massenverteilung im Bereich von 23.1 min bis 26.1 min des LC-HRMS-Laufes des pcPNA₂-Strangs 194.

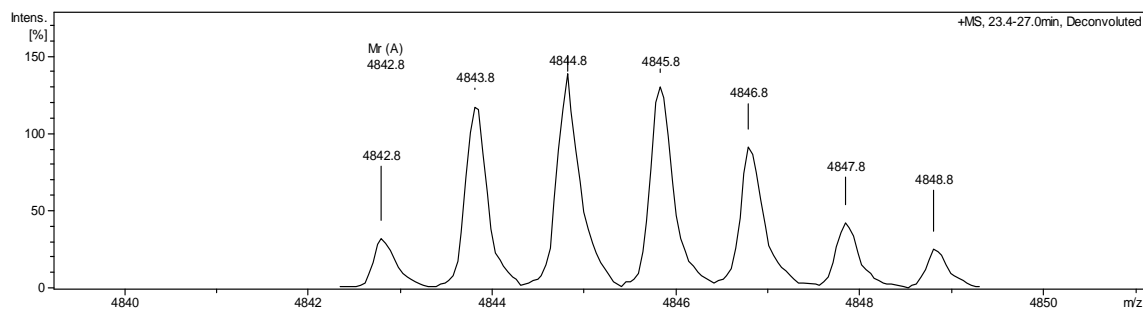


Abbildung 292: Vergrößerte Darstellung des neutralen Spektrums des LC-HRMS-Laufs des pcPNA₂-Strangs 194 im Bereich von 23.1 min bis 26.1 min.

7 Publikationen

Veröffentlichungen

C. Kohlhaas, M. Jenner, A. Kampa, G. S. Briggs, J. P. Afonso, J. Piel, N. J. Oldham: Amino acid-accepting ketosynthase domain from a *trans*-AT polyketide synthase exhibits high selectivity for predicted intermediate, *Chem. Sci.*, **2013**, 4, 3212-3217.

M. Crüsemann, C. Kohlhaas, J. Piel: Evolution-guided engineering of nonribosomal peptide synthetase adenylation domains, *Chem. Sci.*, **2013**, 4, 1041-1045.

M. Jenner, S. Frank, A. Kampa, C. Kohlhaas, P. Pöplau, G. S. Briggs, J. Piel, N. J. Oldham: Substrate specificity in ketosynthase domains from *trans*-AT polyketide synthases, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, 52, 1143-1147.

X. Cai, R. Teta, C. Kohlhaas, M. Crüsemann, R. Ueoka, A. Mangoni, M. F. Freeman, J. Piel: Manipulation of regulatory genes reveals complexity and fidelity in hormaomycin biosynthesis, *Chem. Biol.*, **2013**, 20, 839-846.

K. Jensen, H. Niederkrüger, K. Zimmermann, A. L. Vagstad, J. Moldenhauer, N. Brendel, S. Frank, P. Pöplau, C. Kohlhaas, C. A. Townsend, M. Oldiges, C. Hertweck, J. Piel: Polyketide proofreading by an acyltransferase-like enzyme, *Chem. Biol.*, **2012**, 19, 329-339.

D. C. Gay, G. Gay, A. J. Axelrod, M. Jenner, C. Kohlhaas, A. Kampa, B. Demeler, N. J. Oldham, J. Piel, A. Keatinge-Clay: A close look at a ketosynthase from a *trans*-acyltransferase modular polyketide synthase, *eingereicht*.

Vorträge

30. Tübinger Gespräche, 22.– 24.07.2009, Blaubeuren

Titel: Zur Naphthochinon-Glykosylierung

43. Doktorandenworkshop Naturstoffe: Chemie, Biologie und Ökologie,
27.04.2012, Halle

Titel: Untersuchungen zur Substratspezifität von *trans*-AT Polyketidsynthasen

Posterpräsentationen

C. Kohlhaas, A. Kampa, S. Frank, M. Jenner, N. Oldham, J. Piel: Investigation of KS Domains in *Trans*-AT Polyketide Synthases. International VAAM Workshop 2012, „Biology and Chemistry of Antibiotic-Producing Bacteria and Fungi“, 27.-29.11.2012, Braunschweig

C. Kohlhaas, J. Moldenhauer, H. Niederkrüger, K. Zimmermann, J. Piel: Erzeugung neuartiger Polyketidgerüste durch maßgeschneiderte Enzymtemplate. Workshop SFB 624, 2010, Bad Honnef.

Matthew Jenner, Sarah Frank, Annette Kampa, Christoph Kohlhaas, Geoff S. Briggs, Jörn Piel, Neil J. Oldham: Determining the Specificity of Ketosynthase Domains from *trans*-AT Polyketide Synthases by Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Tolerance and Tunability. Directing Biosynthesis III, 2012, Nottingham.

Matthew Jenner, Sarah Frank, Annette Kampa, Christoph Kohlhaas, Jörn Piel, Neil J. Oldham: Determining the specificity of ketosynthase domains from *trans*-AT polyketide synthases using electrospray ionization-mass spectrometry: functional assignment of biosynthetic pathways. ASMS Annual Meeting, 2012, Vancouver.

8 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die eingereichte Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel und Quellen als die angegebenen benutzt zu haben.

Diese Arbeit ist weder identisch noch teildentisch mit einer Arbeit, die an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn oder einer anderen Hochschule zur Erlangung eines akademischen Grades oder als Prüfungsleistung vorgelegt worden ist.

Die Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn ist mir bekannt.

Christoph Kohlhaas

Bonn, den